

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
26 avril 2001 (26.04.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/29183 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷: C12N 1/20,
C12Q 1/68, A23C 19/032

[FR/FR]; 9, rue Magellan, F-78180 Montigny-le-Breton-
neux (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/02869

(74) Mandataire: BREESE-MAJEROWICZ; 3, avenue de
l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international:
13 octobre 2000 (13.10.2000)

(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/12924 15 octobre 1999 (15.10.1999) FR

(84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*):
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE -INRA- [FR/FR]; 147, rue de l'Uni-
versité, F-75338 Paris Cedex 07 (FR).

Publiée:

— *Sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport.*

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): GUEDON,
Eric [FR/FR]; 26, rue Jules Ferry, F-92100 Boulogne
(FR). ANBA-MONDOLONI, Jamila [FR/FR]; 13, rue
Charles Linné, F-78180 Montigny-le-Bretonneux (FR).
DELORME, Christine [FR/FR]; 15, résidence des Basses
Garennes, F-91120 Palaiseau (FR). RENAULT, Pierre

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*

(54) Title: MUTANT LACTIC BACTERIA WITH A CAPACITY FOR OVEREXPRESSING AT LEAST ONE PEPTIDASE

(54) Titre: BACTERIES LACTIQUES MUTANTES CAPABLES DE SUREXPRIMER AU MOINS UNE PEPTIDASE

(57) Abstract: The invention relates to mutants of lactic bacteria such as *L. lactis* or *S. thermophilus* which can overexpress one or more peptidases, characterised in that at least one of the negative regulation factors of at least one of the peptidase genes of said bacteria is inactivated, said negative regulation factor being selected from a group comprising the gene *codY*, the genes of the operon *lev*, and a gene coding for a protein that is homologous with a β -glucosidase.

(57) Abrégé: La présente invention se rapporte à des mutants de bactéries lactiques, comme *L. lactis* ou *S. thermophilus* capables de surexprimer une ou plusieurs peptidases, caractérisés en ce que l'un au moins des facteurs de régulation négative de l'un au moins des gènes des peptidases desdites bactéries est inactivé, ledit facteur de régulation négative étant choisi dans le groupe comprenant le gène *codY*, les gènes de l'opéron *lev*, un gène codant une protéine homologue à une β -glucosidase.

WO 01/29183 A2

BACTERIES LACTIQUES MUTANTES CAPABLES DE
SUREXPRIMER AU MOINS UNE PEPTIDASE.

La présente invention concerne des mutants de
5 bactéries lactiques, comme *Lactococcus lactis*, capables de
surexprimer au moins une et de préférence plusieurs
peptidases. Ces mutants présentent des activités
peptidolytiques fortes qui permettent d'accélérer la
dégradation de la caséine en acides aminés. Ces mutants
10 sont donc tout particulièrement utiles pour augmenter la
vitesse d'affinage des fromages car les acides aminés sont
des précurseurs dans la synthèse d'arômes. L'invention
concerne également une méthode d'identification de ces
mutants et les constructions génétiques pour la mise en
15 œuvre de cette méthode. L'invention concerne enfin
l'utilisation de ces bactéries mutantes dans un procédé de
fabrication et/ou de maturation de fromages.

Lactococcus lactis possède un système
20 protéolytique complexe pour dégrader les protéines du lait
et en particulier la caséine. La caséine est la protéine
majoritaire du lait qui fournit tous les acides aminés
nécessaires à la croissance (12). La caséine est dégradée
en oligopeptides par une protéase de paroi. Ces
25 oligopeptides entrent dans la cellule par des systèmes de
transport spécifiques puis sont hydrolysés en acides aminés
à l'intérieur de la cellule par des peptidases (14). En
plus de leur rôle dans la nutrition azotée de *L. lactis*,
les peptidases pourraient avoir également un rôle important
30 dans le développement des saveurs lors de l'affinage de
certains fromages.

Dix gènes de peptidases ont été clonés et leurs
produits caractérisés biochimiquement chez *L. lactis*. Elles
sont regroupées dans différentes classes suivant la
35 position et la nature de la liaison peptidique qu'elles

hydrolysent et ont souvent une spécificité large (14). A l'heure actuelle, peu d'études sur la régulation de l'expression de ces peptidases chez *L. lactis* ont été menées et seule la régulation de la protéase de paroi a été
5 étudiée de manière approfondie (18, 19).

Or, l'expression de certains gènes chez *Lactococcus lactis* peut être critique lors de procédés de fabrication de fromages. Aussi, les Inventeurs ont considéré que l'évaluation du niveau d'expression de ces
10 gènes peut se faire en déterminant l'efficacité de leurs promoteurs car la transcription est un des paramètres qui contrôle l'expression des gènes. Les Inventeurs ont donc développé dans le cadre de la présente invention des outils basés sur l'utilisation de gènes rapporteurs. Ils ont
15 construit des vecteurs adaptés à l'étude systématique de nombreux promoteurs dans différents contextes cellulaires et environnementaux et qui peuvent être transférés aisément dans un grand nombre de souches de *L. lactis*. Ces vecteurs ont été utilisés pour étudier la variabilité de
20 l'expression des enzymes du système protéolytique de *L. lactis*. L'expression de seize gènes codant pour des enzymes impliquées dans la protéolyse de la souche de *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 ainsi que les deux gènes de la protéase de paroi des souches WG2 et SK11 a pu ainsi
25 être caractérisée, soit grâce aux vecteurs développés par les Inventeurs, soit grâce à la détection des ARN messagers par la technique de Northern-blot (8).

Les travaux réalisés dans le cadre de la présente invention sur la caractérisation de l'expression
30 des gènes codant pour des peptidases, des protéases et des protéines de transport de *L. lactis* ont permis de mettre en évidence une régulation coordonnée de leur expression et ainsi de déterminer les facteurs pouvant affecter cette expression. Les Inventeurs ont notamment réalisé une étude

systematique de la transcription des seize gènes ci-dessus impliqués dans la protéolyse.

Il a ainsi été montré que la transcription de 8 des seize gènes testés est régulée et réprimée simultanément par des dipeptides via le pool intracellulaire d'acides aminés branchés : isoleucine, leucine et valine. Il s'agit des promoteurs des gènes des peptidases suivants :

- *prtP*, qui est la protéase de paroi (14), et plus particulièrement *prtPWG* qui est une protéase de paroi isolée de la souche WG2, et *prtPSK11*, qui est une protéase de paroi isolée de la souche SK11,

- *pepN* et *pepC*, qui sont les aminopeptidases de spécificité générale majeure dans la cellule (14),

- *pepO*, qui est une endopeptidase impliquée dans la dégradation des oligopeptides (14),

- *opp*, qui est l'opéron codant pour le système d'entrée des oligopeptides (14),

- *dtpt*, qui code pour une protéine de transport des di et tripeptides hydrophiles (14),

- *pepDA2*, qui code pour une dipeptidase générale.

Il a aussi été montré dans le cadre des travaux ayant conduit à la présente invention que la transcription des gènes du système protéolytique chez *L. lactis* est régulée par les produits de divers gènes. On peut citer tout particulièrement le gène *codY* qui constitue un régulateur central réprimant la transcription des gènes du système protéolytique chez *L. lactis*. On peut encore citer l'un des gènes de l'opéron *lev* et un gène codant pour une β -glucosidase.

Les Inventeurs ont donc mis en œuvre une stratégie de mutagenèse aléatoire, appliquée à la souche MG1363 (21), pour trouver des régulateurs de la transcription de ces peptidases. La fusion du second

promoteur de l'opéron *opp-pepO* (*PpepOA*) au gène de la β -galactosidase a servi de rapporteur pour visualiser des mutants dont la transcription de ce promoteur est dérégulée. Les inventeurs ont ainsi isolé des mutants de *L. lactis*, obtenus par insertion d'un transposon.

La présente invention a donc pour objet des mutants de bactéries lactiques capables de surexprimer une ou plusieurs peptidases, caractérisés en ce que l'un au moins des facteurs de régulation négative de l'un au moins des gènes des peptidases desdites bactéries est inactivé.

Il peut s'agir d'une inactivation totale ou partielle. On entend par inactivation totale, le fait que ledit facteur n'est pas du tout exprimé, et par inactivation partielle, le fait que ledit facteur est encore exprimé mais pas suffisamment pour observer l'effet de régulation négative rencontré chez une bactérie non mutée.

L'invention concerne tout particulièrement, des mutants de bactéries lactiques capables de surexprimer une ou plusieurs peptidases, caractérisés en ce que l'un au moins des facteurs de régulation négative de l'un au moins des gènes des peptidases desdites bactéries est inactivé, ledit facteur de régulation négative étant choisi dans le groupe comprenant le gène *codY*, les gènes de l'opéron *lev*, un gène codant une protéine homologue à une β -glucosidase.

Comme indiqué précédemment, ladite inactivation peut être totale ou partielle.

Une première forme de réalisation d'une telle inactivation consiste en une modification de la séquence d'ADN de l'un desdits gènes ou d'une séquence impliquée dans l'expression ou la régulation de ce gène. Une seconde forme de réalisation d'une telle inactivation consiste en une modification d'un gène codant pour une protéine cofacteur nécessaire à l'activité de l'un desdits gènes

et/ou la modification d'un gène impliqué dans l'expression ou la régulation de cette protéine cofacteur.

5 A titre de bactéries lactiques mutantes selon l'invention, on peut citer plus particulièrement des mutants de *L. lactis* et de *S. thermophilus*.

10 On entend tout particulièrement par mutants de bactéries lactiques selon l'invention, des bactéries génétiquement modifiées de façon à ce que l'un au moins des facteurs de régulation négative de l'un au moins des gènes
15 desdites peptidases est inactivé totalement ou partiellement. Ainsi, on entend par inactivation, la modification d'un ou plusieurs gènes codant pour des protéines constituant un ou plusieurs facteurs de
20 régulation négative des gènes des peptidases, comme par exemple CODY, ou la modification d'un ou plusieurs gènes codant pour des protéines nécessaires auxdits facteurs de régulation négative des gènes des peptidases, comme par
25 exemple les éléments de transport des acides aminés branchés ou une protéine nécessaire à l'activité de CODY. Les mutants de bactéries lactiques selon l'invention sont donc avantageusement obtenus par mutagenèse.

30 L'invention se rapporte plus particulièrement à des mutants de bactéries lactiques capables de surexprimer une ou plusieurs peptidases, caractérisés en ce que l'un au moins des facteurs de régulation négative commun à
35 plusieurs gènes desdites peptidases est inactivé.

L'invention concerne plus particulièrement des mutants de bactéries lactiques et notamment de *Lactococcus*
40 *lactis* dont l'un au moins des facteurs de régulation négative de la transcription, commun à deux au moins et de préférence trois des promoteurs des gènes de peptidases, est inactivé.

45 Les promoteurs des gènes de peptidases dont l'un au moins des facteurs de régulation négative de la

transcription est inactivé, sont par exemple choisis parmi les gènes *prtP*, *pepN*, *pepC*, *pepX*, *pepO*, *pepDA2*, *dtpT* et l'opéron *opp*.

5 Il sera fait référence dans ce qui suit à la liste de séquences en annexe dans laquelle :

- SEQ ID No. 1 représente la séquence du gène *codY* de *L. lactis* MG1363.

10 - SEQ ID No. 2 représente la séquence du gène *dtpT* *L. lactis* MG1363.

- SEQ ID No. 3 représente la séquence du gène *secA* de *L. lactis* IL1403.

- SEQ ID No. 4 représente la séquence du gène *secY* de *L. lactis* IL1403.

15 - SEQ ID No. 5 représente la séquence de l'opéron *lev* de *L. lactis* IL1403.

- SEQ ID No. 6 représente un fragment de séquence d'un gène de *L. lactis* MG1363 dont le produit est homologue à une β -glucosidase.

20 - SEQ ID No. 7 représente la séquence du gène de *L. lactis* MG1363 dont le produit est homologue à une formate déshydrogénase.

- SEQ ID No. 8 représente une partie de la séquence du gène *codY* de *S. thermophilus*.

25 - SEQ ID No. 9 représente la séquence complète du gène *codY* de *S. thermophilus*.

30 Un premier facteur de régulation négative des peptidases de bactéries lactiques notamment de *L. lactis* identifié par les Inventeurs est constitué par le pool intracellulaire d'acides aminés branchés qui répriment la transcription de plusieurs gènes de peptidase. Un premier type de mutants est donc caractérisé par la modification de ce pool intracellulaire d'acides aminés branchés. On entend
35 de préférence par modification, une diminution de la

quantité d'acides aminés branchés. Un exemple de modification du pool d'acides aminés branchés consiste à modifier sélectivement leur entrée dans la cellule, notamment en bloquant l'un au moins des systèmes de transport :

- des acides aminés,
- des di- et tripeptides,
- des oligopeptides.

Des mutants de *L. lactis* dont l'un au moins des systèmes de transport des acides aminés branchés, des di- et tripeptides ou des oligopeptides sont bloqués sont des mutants dans lesquels l'un au moins des gènes codant pour un élément de ces systèmes de transport est inactivé.

Des mutants d'un système de transport des dipeptides et tripeptides ont été obtenus par mutagenèse aléatoire dans le gène *dtpt* (10) de *L. lactis* dont la séquence est donnée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID No. 2. Les travaux réalisés dans l'art antérieur sur ce gène n'ont jamais mis en évidence qu'il pouvait s'agir de mutants de *Lactococcus lactis* capables de surexprimer une ou plusieurs peptidases. Un exemple de gène *dtpt* modifié dans un mutant est caractérisé par l'insertion par exemple du plasmide *pGhost-IIS1* après les nucléotides en positions 280 et 470 dans la séquence SEQ ID No. 2.

La répression de la transcription des gènes codant pour les peptidases est levée chez les mutants de l'invention et peut résulter comme indiqué précédemment de la variation du pool intracellulaire des acides aminés branchés. La variation du pool intracellulaire des acides aminés branchés peut également provenir de la variation de la dégradation desdits peptides (di, tri ou oligopeptides). En conséquence, des mutants de bactéries lactiques et plus particulièrement de *L. lactis* sont des mutants dans lesquels l'un au moins des gènes codant les peptidases

responsables de la dégradation de ces dipeptides, tripeptides ou oligopeptides est inactivé.

Un facteur important de régulation négative
5 identifié par les inventeurs est le produit du gène *codY*
qui réprime la transcription de plusieurs peptidases au
niveau de leur promoteur. En effet, les inventeurs ont
obtenu par mutagenèse des mutants de *L. lactis* inactivés
dans un gène qui est homologue au gène *codY* de *Bacillus*
10 *subtilis*. Chez un mutant *codY* reconstruit par les
inventeurs par mutagenèse dirigée, il a été observé que la
transcription du gène *pepOA* et la transcription d'au moins
trois gènes de peptidases ne sont plus réprimés par les
dipeptides. Ainsi, l'inactivation du gène *codY* chez
15 *L. lactis* permet d'augmenter l'expression des gènes de
plusieurs peptidases d'un facteur 4 à 55 dans un milieu
contenant une source de peptides qui normalement les
répriment dans la souche sauvage.

La séquence d'ADN du gène *codY* de *L. lactis* et
20 de la séquence de la protéine *codY* pour lequel il code sont
représentées dans SEQ ID No. 1 en annexe.

Les inventeurs ont également mis en évidence la
présence du gène *codY* chez *S. thermophilus*, qui est comme
L. Lactis une bactérie lactique. La séquence d'ADN
25 partielle du gène *codY* de *S. thermophilus* et la séquence de
la protéine pour lequel il code sont représentées dans SEQ
ID No. 8 en annexe. La séquence d'ADN complète du gène *codY*
de *S. thermophilus* et la séquence de la protéine pour
lequel il code sont représentées dans SEQ ID No. 9 en
30 annexe. Ainsi l'inactivation complète ou partielle du gène
codY chez les autres bactéries lactiques (*Streptocoque*,
Lactobacille, *Pediocoque*, *Leuconostoc*) pourrait également
permettre d'augmenter l'expression des peptidases.

En conséquence, un type préféré de mutants de
35 bactéries lactiques selon l'invention, plus

particulièrement de *L. lactis*, est caractérisé par l'inactivation du gène *codY*. Un premier exemple d'une telle inactivation consiste en une modification de la séquence d'ADN du gène *codY*, tout particulièrement des séquences SEQ ID No. 1, 8 ou 9 en annexe, ou d'une séquence impliquée dans l'expression ou la régulation de ce gène. Un second exemple d'une telle inactivation consiste en une modification d'un gène codant pour une protéine cofacteur nécessaire à l'activité du gène *codY* et/ou la modification d'un gène impliqué dans l'expression ou la régulation de cette protéine cofacteur.

Comme indiqué précédemment, dans les bactéries mutantes pour *codY* de l'invention l'expression d'au moins 3 peptidases est augmentée de 4 à 55 fois dans un milieu contenant une source de peptides qui normalement répriment leur expression. Une bactérie mutante pour *codY* selon l'invention interrompt la cascade de régulation qui conduit à la répression des peptidases via le pool de peptides du milieu extérieur. Un changement de la séquence d'ADN dans le gène *codY* ou dans sa séquence de régulation consiste par exemple en une mutation ou une délétion qui peuvent être réalisées par des méthodes bien connues de mutagenèse. Ainsi les inventeurs ont répertorié 13 mutants de *codY* avec par exemple une insertion du plasmide *pGhost-IIS1* après les nucléotides en positions 87, 112, 122, 289, 313, 409, 575, 604, 641, 693, 821, 877 et 882 dans la séquence SEQ ID No. 1.

Comme indiqué précédemment, d'autres mutants de bactéries lactiques, notamment de *L. lactis*, capables de surexprimer une ou plusieurs peptidases ont été caractérisés par les Inventeurs. Il s'agit de mutants dans lesquels l'un au moins des facteurs de régulation négative de la transcription d'un ou plusieurs gènes desdites

peptidases est inactivé. A titre d'exemples de tels mutants, on peut citer :

- Les mutants dans lesquels un gène codant pour des protéines impliquées dans la sécrétion des protéines de transport des dipeptides ou tripeptides est inactivé. Il s'agit plus particulièrement de mutants dont l'un au moins des gènes *secA* (3) et *secY* (13) est modifié. Les protéines codées par ces gènes pourraient intervenir dans la translocation de la protéine DtpT qui est impliquée dans le transport des di- et tripeptides. Les séquences des gènes *secA* et *secY* de *L. lactis* sont données dans la liste de séquences en annexe respectivement sous les numéros SEQ ID No. 3 et SEQ ID No. 4. Des mutants pour *secA* ont été préparés par insertion du plasmide *pGhost-IIS1* après les nucléotides en positions 1689 et 1698 dans la séquence SEQ ID No. 3. Des mutants pour *secY* ont été préparés par insertion du plasmide *pGhost-IIS1* après les nucléotides en positions 1273 et 1281 dans la séquence SEQ ID No. 4.

- Les mutants dans lesquels l'un des gènes de l'opéron *lev* est inactivé (17). Les gènes de l'opéron *lev* codent pour un système de transport des sucres. La séquence de l'opéron *lev* de *L. lactis* est donnée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID No. 5. Des mutants pour l'opéron *lev* selon l'invention ont été préparés par insertion du plasmide *pGhost-IIS1* après les nucléotides en positions 40, 108, 1075, 1140, 1145 et 2735 dans la séquence SEQ ID No. 5.

- Les mutants dans lesquels l'un au moins des gènes présentant une homologie avec un gène codant une protéine dont la structure est du type de celle d'une β -glucosidase et/ou une formate deshydrogénase est inactivé. La séquence d'un gène codant cette protéine homologue à une β -glucosidase est donnée dans la liste de séquences en annexe sous les numéros SEQ ID No. 6. La séquence d'un gène

codant une formate deshydrogénase est donnée dans la liste de séquences en annexe sous les numéros SEQ ID No. 7.

Comme précédemment, on entend par un gène inactivé un gène dont la séquence ou une séquence impliquée dans son expression ou sa régulation sont modifiées.

En conséquence, un autre type préféré de mutants de bactéries lactiques selon l'invention, plus particulièrement de *L. lactis*, est caractérisé par l'inactivation de l'un des gènes de l'opéron *lev*. Un premier exemple d'une telle inactivation consiste en une modification de la séquence d'ADN de l'un des gènes de l'opéron *lev*, tout particulièrement de la SEQ ID No. 5 annexe, ou d'une séquence impliquée dans l'expression ou la régulation de l'un des gènes de cet opéron. Un second exemple d'une telle inactivation consiste en une modification d'un gène codant pour une protéine cofacteur nécessaire à l'activité de l'un des gènes de l'opéron *lev* et/ou la modification d'un gène impliqué dans l'expression ou la régulation de cette protéine cofacteur.

Un troisième type préféré de mutants de bactéries lactiques selon l'invention, plus particulièrement de *L. lactis*, est caractérisé par l'inactivation d'un gène codant pour une protéine homologue à une β -glucosidase. Un premier exemple d'une telle inactivation consiste en une modification de la séquence d'ADN d'un gène codant pour une β -glucosidase, tout particulièrement de la SEQ ID No. 6 annexe, ou d'une séquence impliquée dans l'expression ou la régulation de ce gène. Un second exemple d'une telle inactivation consiste en une modification d'un gène codant pour une protéine cofacteur nécessaire à l'activité d'un gène codant pour une β -glucosidase et/ou la modification d'un gène impliqué dans l'expression ou la régulation de cette protéine cofacteur.

Bien entendu, les mutants selon l'invention peuvent également être caractérisés par plusieurs des mutations décrites ci-dessus.

5 Comme indiqué précédemment les Inventeurs ont développé dans le cadre de la présente invention des outils basés sur l'utilisation de gènes rapporteurs comme la luciférase de *Vibrio harveyi*. L'expression de la luciférase qui se détecte par une émission de lumière, permet de
10 mesurer facilement l'activité des promoteurs y compris dans des milieux complexes (4). Les vecteurs pVar construits par les Inventeurs contiennent une origine de répllication inactivée après intégration, un marqueur d'antibiotique et une partie du gène *cluA* (6). Ce dernier fragment permet au
15 plasmide de s'intégrer par recombinaison homologue dans le facteur sexuel. Celui-ci est un élément conjugatif de 60 kb présent sous forme intégrée dans le chromosome de certaines souches de *L. lactis*. Les constructions intégrées dans le facteur sexuel au niveau du gène *cluA* dans une souche
20 peuvent donc être transférées dans de nombreuses souches de *L. lactis* par conjugaison.

 L'invention concerne donc aussi, un vecteur recombinant pour identifier ou sélectionner les bactéries mutantes selon l'invention. Ce vecteur est caractérisé en
25 ce qu'il comprend un gène marqueur fusionné à un gène de peptidase ou un promoteur de gène, une origine de répllication inactivée après intégration dans la bactérie, un marqueur antibiotique, et une partie du gène *cluA*.

 Un tel vecteur permet de distinguer une souche
30 mutante selon l'invention d'une souche sauvage incapable de surexprimer une ou plusieurs peptidases. Une méthode permettant de distinguer ces souches est par exemple la suivante. Pour connaître le niveau d'expression des peptidases dans des souches, un vecteur pVar contenant le
35 promoteur *PpepOA* de l'opéron *opp-pepO*, fusionné au gène de

la luciférase, est transféré dans les souches par conjugaison. Les mesures de l'activité luciférase sous le contrôle du *PpepOA* indiquent si la transcription au moins du gène *pepO* est dérégulée dans ces souches. Les constructions avec les autres promoteurs permettent de vérifier le nombre de gènes de peptidases dont la transcription est dérégulée. Les activités luciférases de référence de la souche sauvage qui reflètent la répression de la transcription des gènes de peptidases lors de croissance en présence de peptides, via le pool d'acides aminés branchés, sont répertoriés dans la figure 1.

En conséquence, l'invention concerne également une méthode d'identification ou de sélection d'une bactérie lactique mutante selon l'invention, caractérisée en ce que l'on transfère un gène de peptidase ou un promoteur de ce gène dans une bactérie par conjugaison avec le vecteur défini ci-dessus, puis l'on cultive ladite bactérie en présence de peptides et l'on mesure par tout moyen approprié l'activité du gène rapporteur qui reflètent la répression de la transcription des gènes de peptidases.

Avantageusement le gène rapporteur est le gène de la luciférase.

L'invention concerne également l'utilisation des mutants de bactéries lactiques tels que décrits précédemment ou un mélange de ceux-ci dans un procédé de fabrication et/ou de maturation du fromage. De façon avantageuse, les mutants de bactéries lactiques tels que décrits précédemment ou un mélange de ceux-ci sont utilisés dans un procédé de fabrication et/ou de maturation de fromages type pâte molle ou pâte pressée.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent. Ces exemples concernent l'obtention par mutagenèse de mutants

de *L. lactis* selon l'invention, et se réfèrent aux figures en annexe dans lesquelles :

- la figure 1 représente l'activité luciférase de différentes fusions transcriptionnelles à D.O. 0,4 en milieu chimiquement défini (CDM) acides aminés (AA) et CDM casitone (Cas),

- la figure 2 représente la répression de la transcription en A des promoteurs régulés, et en B des promoteurs non régulés. Ces résultats ont été obtenus à partir de l'extraction des ARNm totaux de la souche sauvage cultivée en CDM + acides aminés (AA) et CDM + casitone (Cas) à différentes densités optiques (0,2; 0,6; 0,8; 1,2). Les hybridations ont été effectuées avec différentes sondes spécifiques des promoteurs de peptidases. Les promoteurs régulés correspondent à une diminution de l'ARN dans les conditions de croissance en présence de casitone, ce qui est le reflet d'une répression de la transcription.

- La figure 3 est une représentation schématique des différents facteurs intervenant sur l'expression des peptidases de *L. lactis* et ayant permis de concevoir les différents mutants de l'invention.

- La figure 4 est un alignement des séquences des gènes *codY* de *L. lactis* et de *Bacillus subtilis*.

I - Matériel et Méthodes.

1) Souches bactériennes, milieux, vecteurs et manipulations d'ADN.

La souche de *L. lactis* MG1363 a été cultivée à 30°C en milieu M17 glucose. Au besoin, 5µg/ml d'érythromycine sont ajoutés au milieu de culture. Les promoteurs de peptidases à étudier (PepP, PepA, PepF2, PepDA1, PepOA, PepQ, PepX, PepOD, PepM, PepT, PepN et PepC) et les deux promoteurs de l'opéron *opp* (*pepOA/pepOD*) ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques à

partir du chromosome de la souche de *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363. Une série de vecteurs à répllication conditionnelle, contenant les gènes rapporteurs de la luciférase de *Vibro harveyi* et un fragment du facteur sexuel (gène *cluA*) a été construite. Le pVar-1 a été utilisé pour fusionner aux gènes luciférase, les fragments d'ADN obtenus par PCR et correspondant aux différents promoteurs.

2) Intégration des fusions transcriptionnelles sur le chromosome de MG1363 et conjugaison.

Après transformation de la souche MG1363 par les plasmides pVar-1 contenant les promoteurs de peptidases, les fusions sont intégrées dans le chromosome par recombinaison homologue, soit au locus promoteur peptidase, soit au locus du facteur sexuel (dans le gène *cluA*). L'identification du locus d'intégration se fait grâce à des amorces appropriées par amplification PCR et par hybridation d'un gel Southern. Le transfert du facteur sexuel se fait par conjugaison entre deux souches (5).

3) Détermination de l'activité luciférase chez *L. lactis*.

Les mesures d'activité luciférase sont effectuées sur le luminomètre Bertold Lumat LB9501. Un millilitre de culture de *L. lactis* est mélangé avec 5µl de nonaldehyde et l'émission de lumière est directement mesurée. La valeur du pic est ramenée à la DO_{600nm} de la culture et l'activité luciférase est mesurée tout au long de la croissance. L'activité luciférase reportée dans la figure 1 est mesurée à $DO_{600nm} = 0,4$ et exprimée en 10^3 lux/DO.

4) Milieu Chimiquement Défini (CDM).

Ce milieu chimiquement défini (CDM) est décrit dans Sissler et al. (22). La source d'azote de ce milieu est un mélange d'acides aminés. Dans le "CDM cas", est ajouté un extrait de casitones (caséines du lait dégradées par des enzymes pancréatiques) qui est une source de petits peptides.

5) Constructions: PpepOA- β gal.

Le second promoteur de l'opéron *opp-pepO* (PpepOA) de la souche MG1363 a été amplifié par les oligonucléotides suivant (GGGAATTCTTTGGGAACAATGATAA et CGGGATCCGTTACTTCTGAACCA) et le fragment amplifié de 500pb a été cloné dans le plasmide pJIM762 au site *EcoRI-BamHI* en amont du gène de la β -galactosidase de *Escherichia coli* (E. Guédon, résultats non encore publiés). Ce plasmide, dont le gène de la β -galactosidase est sous le contrôle des signaux d'expressions de PpepOA, a été intégré dans le chromosome de la MG1363 par recombinaison homologue au locus promoteur. La transcription à PpepOA est réprimée par les dipeptides contenu dans la casitone du milieu et la souche contenant la fusion est blanche sur un milieu chimiquement défini (CDM) contenant des casitones. La transcription à PpepOA est dérèprimée sur un milieu CDM contenant des acides aminés comme source d'azote et la souche contenant la fusion est bleue [dans les deux cas la souche est cultivée avec du phospho- β -galactoside (P- β -gal)].

6) Plasmide Pghost8-ISS1.

Ce plasmide à réplication conditionnelle (protéine de réplication thermosensible) possède un marqueur d'antibiotique tétracycline et une séquence d'insertion ISS1 (16). L'augmentation de la température de 30°C à 37°C inhibe la réplication de ce plasmide et les souches résistantes à la tétracycline obtenues contiennent le plasmide intégré dans le chromosome. Il s'intègre de

façon aléatoire dans le chromosome de *L. lactis* par transposition répllicative (16).

7) Mutagenèse par transposition.

Une mutagenèse aléatoire est effectuée avec le plasmide thermosensible pGhost8-ISS1 dans la souche MG1363 contenant la fusion promoteur PpepOA- β -gal. En milieu MCD casitone, en présence de P- β -gal, sur 50000 clones blancs isolés, 46 présentent un phénotype de couleur bleue. Dans ces mutants l'expression de la fusion β -gal est dérégulée. Le plasmide pGhost8-ISS1 est donc inséré dans un gène dont le produit est un répresseur direct ou indirect de l'expression de PpepOA.

8) Identification des mutants par clonage des jonctions.

La transposition par ISS1 dans le chromosome donne une insertion du pGhost8 entouré d'une copie dupliquée de ISS1. Les jonctions ont été clonées, en utilisant des sites uniques de restriction (*EcoRI* et *HindIII*) présents sur le pGhost8. La digestion du chromosome par ces enzymes permet d'obtenir le plasmide pGhost8 contenant les régions flanquantes. Le site de transposition est ainsi caractérisé par séquençage des jonctions avec les oligonucléotides suivants (pour la jonction *EcoRI* : TCACCTCATATAAATTCCCCA et AAATGGAACGCTCTTCGG) (pour la jonction *HindIII* : CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC et ACCAACAGCGACAATAATCACA).

9) Mutant *codY*.

Une mutagenèse aléatoire a permis d'obtenir entre autre, des mutants *codY* pour lesquels la transcription de plusieurs gènes codant pour des enzymes protéolytiques est dérégulée. L'inactivation de ce gène chez *L. lactis* augmente l'expression des gènes *opp-pepO*,

pepN et *pepC* respectivement d'un facteur 55, 14 et 4 en milieu CDM avec casitones où l'expression est normalement réprimée par la source de peptides.

5 10) Inactivation de *codY* par simple crossing-over.

Un fragment PCR de 540 pb a été amplifié par les oligonucléotides suivants (CAGTATGACTGAACGCTTGGC et GCGATAACATGCCCTTCTTCA) et cloné dans le plasmide pJIM2242.
10 Ce plasmide est intégré dans le gène *codY* par simple crossing-over et un mutant *codY* est vérifié par une hybridation Southern. Ce mutant a le même phénotype que les mutants *codY* obtenus par mutagenèse.

15 11) Autres mutants.

La mutagenèse aléatoire a permis d'identifier plusieurs mutants autre que *codY*. Des mutations des gènes *dtgT*, de l'opéron *lev*, *secA*, *secY*, et des gènes codant pour une hélicase, une β -glucosidase et une enzyme homologue à
20 une formate déshydrogénase ont également conduit à des mutants surexprimant au moins *pepO* ou plusieurs peptidases.

II - Résultats.

25 1) Construction du vecteur pVar-1.

Des vecteurs intégratifs permettant de suivre l'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur sur le chromosome ont été construits. Les gènes de la luciférase de *Vibrio harveyi* ont été utilisés comme
30 gène rapporteur. L'activité luciférase des fusions transcriptionnelles avec les promoteurs de gènes de peptidases est le reflet de l'expression des gènes de peptidases (11, 20). Un vecteur qui se réplique de façon conditionnelle a été utilisé pour intégrer les fusions
35 transcriptionnelles sur le chromosome (15). Ce vecteur a

été conçu pour être facilement transférable par conjugaison, en particulier dans des souches industrielles difficilement transformables. Un fragment (gène *cluA*) de l'élément chromosomique de 60kb nommé le facteur sexuel, que possèdent certaines souches de lactocoques, a été introduit dans ce vecteur. Cet élément est capable de s'auto-transférer à une haute fréquence par conjugaison dans l'espèce *L. lactis* (7). En intégrant nos fusions transcriptionnelles dans ce facteur sexuel, celles-ci sont alors transférables à d'autres souches de lactocoques par conjugaison du facteur sexuel. Parmi différents vecteurs construits, le pVar-1 utilisé dans cette étude contient, en plus des composants décrits ci-dessus un gène de résistance à l'érythromycine. Il a été vérifié que les fusions transcriptionnelles intégrées au locus promoteur ou dans le gène *cluA* avec le pVar-1 avaient des activités luciférases identiques (9).

2) Expression de fusions avec les promoteurs des gènes codant pour des peptidases.

Les promoteurs de 11 gènes codant pour des peptidases (*pep*) de *L. lactis* MG1363 : *pepA*, *pepC*, *pepDA1*, *pepF2*, *pepM*, *pepN*, *pepP*, *pepQ*, *pepT*, *pepX* ; et les deux promoteurs de l'opéron *opp-pepO* (*PpepOA* et *PpepOD*) dans lequel se trouve le gène *pepO*, ont été clonés, fusionnés au gène *lux* dans le vecteur pVar-1 et intégrés par recombinaison homologue dans le chromosome de *L. lactis* MG1363 au locus des différents promoteurs. Les deux promoteurs de protéase (*prt* des souches WG2 et SK11) sont fusionnés au gène luciférase sur un plasmide. L'expression de ces fusions a été déterminée en milieu CDM et CDM cas et les valeurs des mesures luciférases sont rapportées dans la figure 1. En milieu CDM, selon le taux de luciférase mesuré, les fusions ont été regroupées en différentes classes. La plus forte activité luciférase est obtenue avec

les fusions plasmidiques contenant les promoteurs des gènes *prt* ($10 \cdot 10^3$ lux/DO (10^3)). Pour les fusions chromosomiques, la plus forte activité luciférase est obtenue avec les promoteurs *PpepN*, *PpepC*, *PpepOA* et *PpepOD* (1 à $5 \cdot 10 \cdot 10^3$ lux/DO (10^3)), une activité moyenne est obtenue avec les promoteurs des gènes *pepQ*, *pepX*, *pepM* et *pepT* (200 à 300 lux/DO (10^3)) et une activité faible est obtenue avec les promoteurs des gènes *pepP*, *pepA*, *pepF2* et *pepDA1* (20 à 80 lux/DO (10^3)). Il est à remarquer que les niveaux d'expression les plus élevés sont obtenus avec des fusions contenant les promoteurs des gènes codant pour les peptidases de très large spécificité (*pepC*, *pepN*, *pepO*) et pour un système de transport des oligopeptides (*Opp*) qui est essentiel à la croissance des lactocoques en milieu lait. L'expression des gènes de peptidases est diminuée en milieu CDM cas qui contient une source d'azote constituée d'acides aminés et de peptides (figure 1). La force des promoteurs *PpepP*, *PpepA*, *PpepF2*, *PpepDA1*, *PpepQ*, *PpepT* et *PpepM* est diminuée de 2 à 3 fois en CDM cas tandis que celle des promoteurs *PpepX*, *PpepC*, *PpepN*, *PprtPWG2*, *PprtPSK11*, *pepO*, et l'opéron *opp-pepO* est réprimée respectivement 5, 7, 13, 21, 12 et 153 fois par les dipeptides du milieu de culture via le pool d'acides aminés branchés dans la cellule. L'analyse des transcrits par Northern Blot a permis de confirmer les résultats obtenus avec les fusions transcriptionnelles et de montrer que la transcription des gènes *pepDA2* et *dtpT*, mais non celle de *dtpP*, était réprimée par les peptides de la casitone (figure 2).

3) Obtention et caractérisation de mutants déréprimés.

Sur un milieu riche en peptides et en présence de P- β gal, la souche sauvage contenant la fusion *PpepOA*- β gal donne des colonies blanches car l'expression de la

fusion est réprimée. Les mutants obtenus donnent des colonies bleues car la fusion fusion *PpepOA-βgal* est déréprimée.

Différents gènes des mutants dans lesquels le pGhost s'est inséré ont été identifiés (*codY*, *dtpT*, l'opéron *lev*, *secA*, *secY*, et les gènes codant pour une β-glucosidase et une enzyme homologue à une formate deshydrogénase (*fdh*)). L'analyse des ARNm par Northern Blot d'une souche mutante cultivée dans un milieu riche en peptides, a confirmé que la transcription du gène *pepO* n'est plus réprimée dans les mutants des gènes *codY*, *dtpT*, *fdh* et l'opéron *lev*. La dérepression de *pepO* dans les mutants des gènes codant pour *SecA*, *SecY* et la β-glucosidase reste à être confirmé.

4) Caractérisation de l'expression des peptidases dans les mutants dérégulés.

La transcription des gènes de peptidases a été caractérisée dans les mutants par mesure d'activité. Deux classes de mutants peuvent être obtenues, l'une pour laquelle la transcription de plusieurs peptidases est déréprimée (mutants pléiotropes) et l'autre où seule la transcription du gène *pepO* est déréprimée.

Mutants des gènes *codY*, *dtpT* : dans un milieu riche M17 qui contient des peptides répresseurs, les activités luciférases ont été mesurées dans une souche sauvage et dans un mutant *codY* pour les promoteurs *PpepOD*, *PpepC* et *PpepN*, et dans un mutant *dtpT* pour le promoteur *PpepOD*. Dans un mutant *codY*, la répression de la transcription est diminuée d'un facteur 35, 4 et 14 respectivement pour les gènes *pepOD*, *pepC* et *pepN*. Dans un mutant *dtpT*, la répression de la transcription est diminuée d'un facteur 15 pour le gène *pepOD*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) BOUTROU R., SEPULCHRE A., GRIPON J.C.,
MONNET V., 1998. Simple test for predicting the lytic
5 behavior and proteolytic activity of lactococcal strains in
cheese. *J. Dairy Sci.*, 81, 2321-2328.
- 2) DELORME C., EHRLICH S.D., RENAULT P., 1999.
Regulation of expression of the *Lactococcus lactis*
histidine operon. *J. Bacteriol.*, 181, 2026-2037.
- 10 3) Driessen A., Fekkes P., van der Wolk JP,
"The Sec system" 1998, *Curr. Opin. Microbiol.*, 1(2), 216-
222.
- 4) DROUAULT S., CORTHER G., DELORME C.,
EHRLICH S.D., RENAULT P., 1998. Régulations métaboliques
15 de *Lactococcus lactis* en culture pure ou mixte dans le
lait. *Lait*, 77, 15-23.
- 5) GASSON M. J., SWINDELL S., MAEDA S., DODD
H.M., 1992. Molecular rearrangement of lactose plasmid DNA
associated with high-frequency transfer and cell
20 aggregation in *Lactococcus lactis* 712. *Mol. Microbiol.*, 6,
3213-3223.
- 6) GODON J. J., JURY K., SHEARMAN C. A., GASSON
M. J., 1994. The *Lactococcus lactis* sex-factor aggregation
gene *cluA*. *Mol. Microbiol.*, 12, 655-663.
- 25 7) GODON J. J., PILLIDGE C. J., JURY K.,
GASSON, M. J., 1996. Caractérisation d'un élément
conjugatif original, le facteur sexuel de *Lactococcus*
lactis 712. *Lait*, 76, 41-50.
- 8) Guédon E., Renault P., Ehrlich SD., Delorme
30 C. "Environmental factors involved in the transcriptional
regulation of 18 proteolysis components in Lactococci"
(soumis pour publication).
- 9) E. Guédon, P. Renault, SD Ehrlich et
C. Delorme "Evaluation de la diversité de l'expression
35 génétique chez les lactocoques : développement d'un outil

et son application aux peptidases", accepté pour publication dans Science des aliments).

10) Hagting A. et al., 1994, "The di- and tri-peptide transport protein of *Lactococcus lactis*", J. Biol. Chem., 269, 11391-11399.

11) HILL P. J., REES C. E. D., WINSON M. K., STEWART, G. S. A. B., 1993. The application of lux genes. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 17, 3-14.

12) JUILLARD V., LE BARS D., KUNJI E. R., KONINGS W. N., GRIPON J. C., RICHARD, J., 1995 . Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3024-3030.

13) Koivula T., Palva I., Hemila H., "Nucleotide sequence of the secY gene from *Lactococcus lactis* and identification of conserved regions by comparison of four secY proteins" 1991, FEBS Lett. 288: 114-8.

14) KUNJI E. R., MIERAU I., HAGTING A., POOLMAN B., KONINGS, W. N., 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70, 187-221.

15) LAW J., BUIST G., HAANDRIKMAN A., KOK J., VENEMA G., LEENHOUTS K., 1995. A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes. *J. Bacteriol.*, 177, 7011-7018.

16) Maguin E., Prevost , Ehrlich SD, Gruss A., "Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other Gram-positive bacteria", 1996, J. Bact. 178, 931-935.

17) Martin-Verstraete I., Debarbouillé M., Klier A., Rapoport G. "Levanase operon of *Bacillus subtilis* includes a fructose specific phosphotransferase system regulating the expression of the operon" 1990, J. Mol. Biol., 244, 657-671.

18) MARUGG J. D., MEIJER W., VAN KRANENBURG R.,
LAVERMAN P., BRUINENBERG P. G., DE VOS W. M., 1995. Medium-
dependent regulation of proteinase gene expression in
Lactococcus lactis, control of transcription initiation by
specific dipeptides. *J. Bacteriol.*, 177, 2982-2989.

19) MEIJER W., MARUGG J. D., HUGENHOLTZ J.,
1996. Regulation of proteolytic enzyme activity in
Lactococcus lactis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 156-161.

20) RENAULT P., CORTHIER G., GOUPIL N., DELORME
C., EHRLICH S.D., 1996. Plasmid vectors for gram-positive
bacteria switching from high to low copy number. *Gene*. 183,
175-182.

21) PREVOST H., EHRLICH S.D., GRUSS A., 1996,
Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other
gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.*, 178 : 931-935.

22) SISSLER M., DELORME C., BOND J., EHRLICH
SD, RENAULT P., FRANCKLYN C., 1999, "An aminoacyl-tRNA
synthetase paralog with a catalytic role in histidine
biosynthesis" *PNAS*, 96:8985-8990.

REVENDEICATIONS

5 1) Mutant de bactérie lactique capable de
surexprimer une ou plusieurs peptidases, caractérisé en ce
que l'un au moins des facteurs de régulation négative de
l'un au moins des gènes des peptidases desdites bactéries
est inactivé, ledit facteur de régulation négative étant
10 choisi dans le groupe comprenant le gène *codY*, les gènes de
l'opéron *lev*, un gène codant une protéine homologue à une
 β -glucosidase.

15 2) Mutant de bactérie lactique selon la
revendication 1, caractérisé en ce que ladite inactivation
est totale ou partielle.

20 3) Mutant de bactérie lactique selon l'une des
revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la séquence
d'ADN de l'un desdits gènes ou d'une séquence impliquée
dans l'expression ou la régulation de ce gène est modifiée.

25 4) Mutant de bactérie lactique selon l'une des
revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'un gène codant
pour une protéine cofacteur nécessaire à l'activité de l'un
desdits gènes et/ou la modification d'un gène impliqué dans
l'expression ou la régulation de cette protéine cofacteur
est modifié.

30 5) Mutant de bactérie lactique selon l'une
quelconque des revendications précédentes, caractérisé en
ce que la bactérie lactique est *L. lactis*.

35 6) Mutant de bactérie lactique selon l'une
quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que
la bactérie lactique est *S. thermophilus*.

7) Mutant de bactérie lactique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le gène *codY* est inactivé.

5

8) Mutant de bactérie lactique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence d'ADN du gène *codY* ou d'une séquence impliquée dans l'expression ou la régulation de ce gène est modifiée.

10

9) Mutant de bactérie lactique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'un gène codant pour une protéine cofacteur nécessaire à l'activité du gène *codY* et/ou un gène impliqué dans l'expression ou la régulation de ladite protéine cofacteur est modifié.

15

10) Mutant de bactérie lactique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'un des gènes de l'opéron *lev* est inactivé.

20

11) Mutant de bactérie lactique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence d'ADN de l'un des gènes de l'opéron *lev* ou d'une séquence impliquée dans l'expression ou la régulation de l'un des gènes de cet opéron est modifiée.

25

12) Mutant de bactérie lactique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'un gène codant pour une protéine cofacteur nécessaire à l'activité de l'un des gènes de l'opéron *lev* et/ou un gène impliqué dans l'expression ou la régulation de ladite protéine cofacteur est modifié.

30.

35

13) Mutant de bactérie lactique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'un gène codant pour une protéine homologue à une β -glucosidase est inactivé.

5

14) Mutant de bactérie lactique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'un gène codant pour une protéine homologue à une β -glucosidase ou une séquence impliquée dans l'expression ou la régulation de ce gène est modifié.

10

15) Mutant de bactérie lactique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'un gène codant pour une protéine cofacteur nécessaire à l'activité d'un gène codant pour une protéine codant pour une β -glucosidase et/ou un gène impliqué dans l'expression ou la régulation de ladite protéine cofacteur est modifié.

15

16) Vecteur recombinant pour identifier ou sélectionner les bactéries lactiques mutantes selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend un gène marqueur fusionné à un gène de peptidase ou un promoteur de ce gène, une origine de répllication inactivée après intégration dans la bactérie, un marqueur antibiotique, et une partie du gène *cluA*.

20

25

17) Méthode d'identification ou de sélection d'une bactérie lactique mutante selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que l'on transfère un gène de peptidase ou un promoteur de ce gène dans une bactérie par conjugaison avec le vecteur selon la revendication 16, puis l'on cultive ladite bactérie en présence de peptides et l'on mesure par tout moyen approprié l'activité du gène rapporteur.

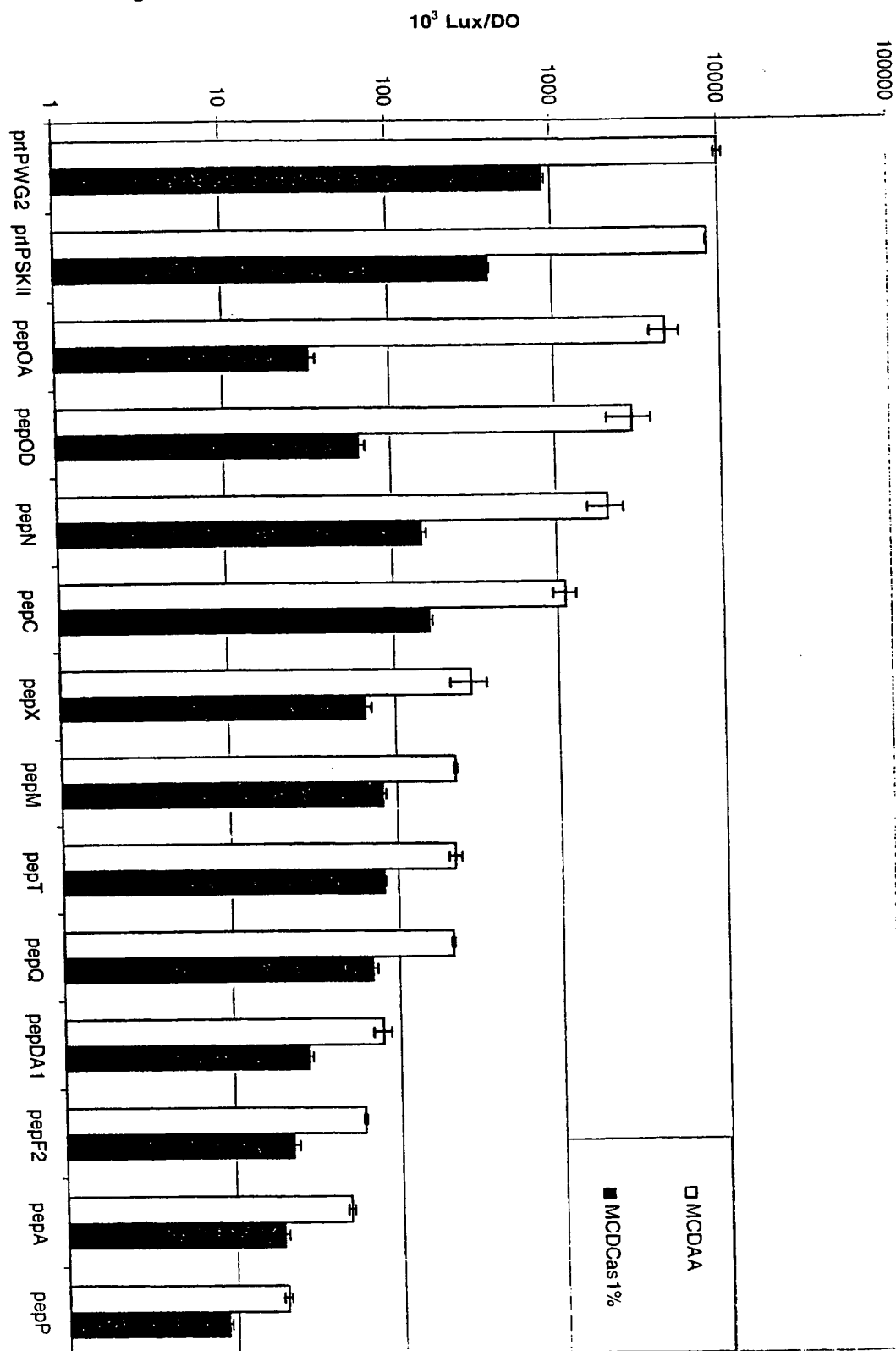
30

35

18) Utilisation des mutants de bactéries lactiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, ou un mélange de ceux-ci dans un procédé de fabrication et/ou de maturation du fromage.

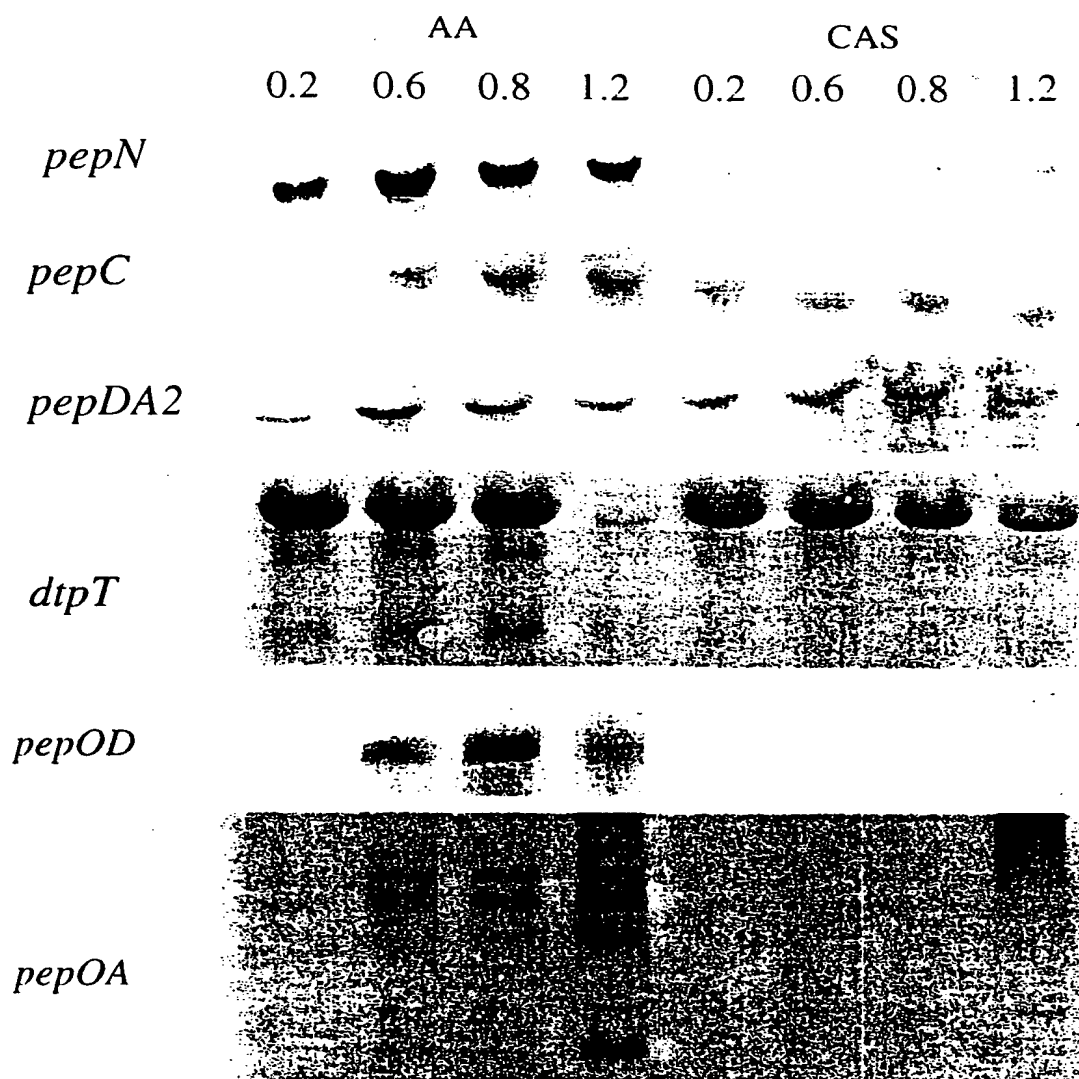
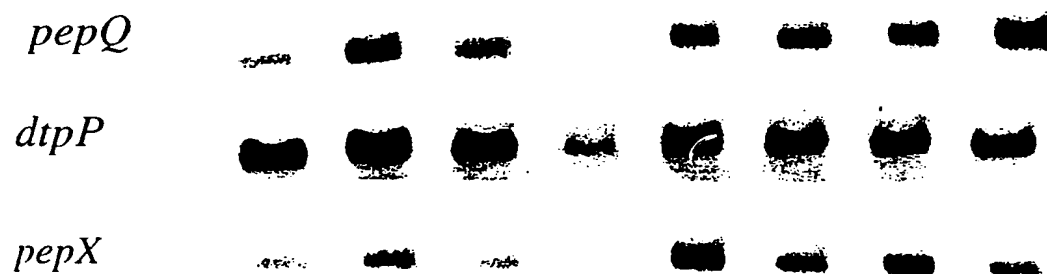
1/4

Fig. 1



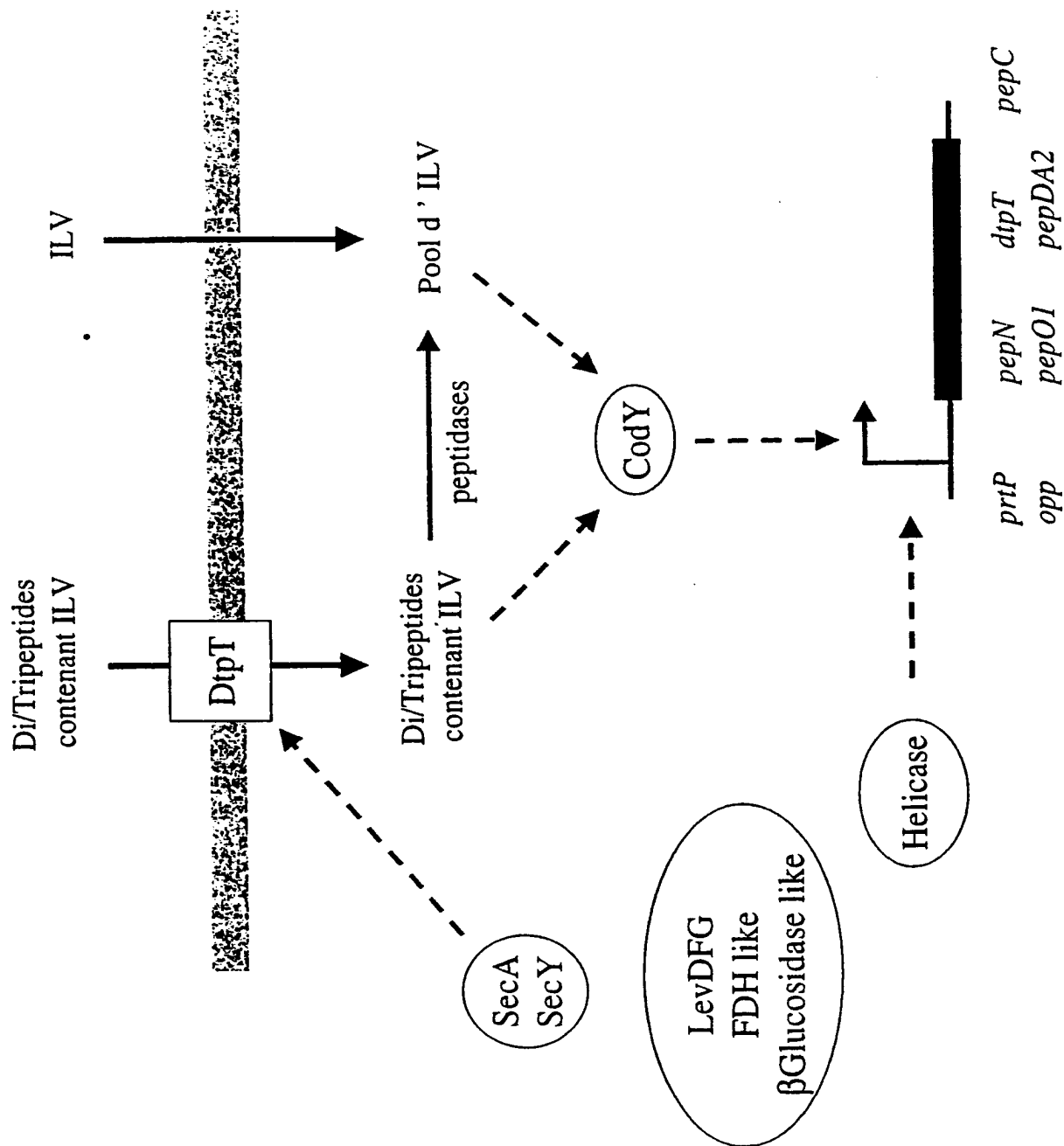
2/4

Fig. 2

A/ Promoteurs régulés**B/ Promoteurs non régulés**

3/4

Fig. 3



4/4

Fig. 4

	1		50
codyMG	~LLEKTRKIT AILQDGVTDL QQELPYNSMT ERLANVIDCN ACVINTKGEL		
codybac	ALLQKTRIIN SMLQAAA... GKPVNFKEMA ETLRDVIDSN IFVVSRRGKL		
	51		100
codyMG	LGYSLPYNTN NDRVDQFFYD RKL PDEYVRA AVRIYDTMAN VPVDRPLAIF		
codybac	LGYSINQQIE NDRMKKMLEL RQFPEEYTKN LFNVPETSSN LDINSEYTAF		
	101		150
codyMG	PEESLSDFPK GVTTLAPIYG SGMRLGTFIM WREDGEFTDD DLVLVELATT		
codybac	PVENRDLFQA GLTTIVPIIG GGERLGTLIL SRLQDQFNDD DLILAEGAT		
	151		200
codyMG	VIGVQLSNLK LEQMEENIRK DTMATMAVNT LSYSEMKAVK AIIIEELDGEE		
codybac	VVGMEILREK AEEIEEEARS KAVVQMAISS LSYSELEAIE HIFEELDGNE		
	201		250
codyMG	GHVIASVIAD KIGITRSVIV NALRKLESAG VIESRSLGMK GTYLVKLNTG		
codybac	GLLVASKIAD RVGITRSVIV NALRKLESAG VIESRSLGMK GTYIKVLNNK		
	251	261	
codyMG	LFDKLAGRNF -		
codybac	FLIELENLKS H		

codyMG, séquence protéique de CodY de *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363
 codybac, séquence protéique de CodY de *B. subtilis*

LISTE DE SÉQUENCES

INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID No. 1

i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SÉQUENCE ID No. 1

A) LONGUEUR :

B) TYPE : ADN

C) NOMBRE DE BRIN : double

D) CONFIGURATION : linéaire

xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE ID No. 1

```

AGAGTAATTT TTCTGACAAT TTTTATTGT TTTTCCATAT GCTTTTTTAT GTTATACTGA 60
TTATGAAAAA TTTTGTATAA AAACAAGAAT ATAAAAAAT AGGAGAACAA AGTGGCTACA 120

TTA CTT GAA AAA ACA CGT AAA ATC ACC GCG ATT TTG CAA GAT GGA GTG 168
Leu Leu Glu Lys Thr Arg Lys Ile Thr Ala Ile Leu Gln Asp Gly Val
  1          5          10          15

ACC GAT TTG CAA CAA GAG TTG CCA TAC AAC AGT ATG ACT GAA CGC TTG 216
Thr Asp Leu Gln Gln Glu Leu Pro Tyr Asn Ser Met Thr Glu Arg Leu
          20          25          30

GCA AAC GTC ATT GAT TGC AAC GCC TGC GTG ATT AAT ACG AAG GGC GAG 264
Ala Asn Val Ile Asp Cys Asn Ala Cys Val Ile Asn Thr Lys Gly Glu
          35          40          45

TTG CTT GGT TAC TCA TTG CCT TAC AAT ACA AAC AAT GAT CGC GTT GAC 312
Leu Leu Gly Tyr Ser Leu Pro Tyr Asn Thr Asn Asn Asp Arg Val Asp
          50          55          60

CAA TTT TTC TAC GAT CGT AAA TTG CCT GAC GAA TAC GTT CGT GCA GCA 360
Gln Phe Phe Tyr Asp Arg Lys Leu Pro Asp Glu Tyr Val Arg Ala Ala
  65          70          75          80

GTA CGT ATT TAC GAT ACA ATG GCA AAC GTT CCT GTT GAT CGT CCT TTA 408
Val Arg Ile Tyr Asp Thr Met Ala Asn Val Pro Val Asp Arg Pro Leu
          85          90          95

GCA ATT TTC CCA GAA GAA AGT CTT AGC GAT TTT CCA AAA GGT GTA ACA 456
Ala Ile Phe Pro Glu Glu Ser Leu Ser Asp Phe Pro Lys Gly Val Thr
          100          105          110

ACT TTA GCG CCT ATC TAT GGT TCT GGA ATG CGT CTT GGA ACA TTT ATT 504
Thr Leu Ala Pro Ile Tyr Gly Ser Gly Met Arg Leu Gly Thr Phe Ile
          115          120          125

ATG TGG CGT GAA GAT GGT GAA TTT ACA GAT GAC GAT CTT GTT TTG GTT 552
Met Trp Arg Glu Asp Gly Glu Phe Thr Asp Asp Asp Leu Val Leu Val
          130          135          140

GAG CTT GCA ACA ACA GTA ATC GGT GTA CAA CTC TCA AAC CTT AAA CTT 600
Glu Leu Ala Thr Thr Val Ile Gly Val Gln Leu Ser Asn Leu Lys Leu
          145          150          155          160

GAA CAA ATG GAA GAA AAT ATC CGT AAA GAC ACT ATG GCA ACA ATG GCT 648
Glu Gln Met Glu Glu Asn Ile Arg Lys Asp Thr Met Ala Thr Met Ala
          165          170          175

```

GTT AAT ACA CTT TCT TAC TCA GAA ATG AAA GCT GTC AAA GCA ATT ATT 696
 Val Asn Thr Leu Ser Tyr Ser Glu Met Lys Ala Val Lys Ala Ile Ile
 180 185 190

GAA GAA CTT GAT GGT GAA GAA GGG CAT GTT ATT GCC TCT GTC ATT GCT 744
 Glu Glu Leu Asp Gly Glu Glu Gly His Val Ile Ala Ser Val Ile Ala
 195 200 205

GAC AAG ATT GGT ATT ACA CGT TCA GTG ATT GTT AAT GCT TTA CGT AAA 792
 Asp Lys Ile Gly Ile Thr Arg Ser Val Ile Val Asn Ala Leu Arg Lys
 210 215 220

CTT GAA TCT GCT GGT GTT ATT GAA TCA CGT TCA CTT GGT ATG AAA GGA 840
 Leu Glu Ser Ala Gly Val Ile Glu Ser Arg Ser Leu Gly Met Lys Gly
 225 230 235 240

ACT TAT CTT AAA GTT CTT AAT ACT GGT TTG TTT GAT AAA CTT GCT GGA 888
 Thr Tyr Leu Lys Val Leu Asn Thr Gly Leu Phe Asp Lys Leu Ala Gly
 245 250 255

CGT AAT TTC TAAAGTCAG AGCTTAACGC TTGTTCTTTT ATCATTGTGTT 937
 Arg Asn Phe
 259

INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID No. 2

i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SÉQUENCE ID No. 2

A) LONGUEUR :

B) TYPE : ADN

C) NOMBRE DE BRIN : double

D) CONFIGURATION : linéaire

xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE ID No. 2

Met Arg Ala Ile Leu Val Tyr Tyr Leu Tyr Ala Leu Thr Thr Ala Asp
 1 5 10 15

AAC GCA GGT TTA GGA CTT CCT AAA GCT CAG GCA ATG GCG ATT GTA AGT 96
 Asn Ala Gly Leu Gly Leu Pro Lys Ala Gln Ala Met Ala Ile Val Ser
 20 25 30

ATT TAT GGT GCA CTT GTC TAT CTT TCA ACA ATT GTT GGG GGA TGG GTT 144
 Ile Tyr Gly Ala Leu Val Tyr Leu Ser Thr Ile Val Gly Gly Trp Val
 35 40 45

GCT GAC CGG TTG TTG GGC GCT TCG CGC ACA ATC TTC TTG GGT GGT ATT 192
 Ala Asp Arg Leu Leu Gly Ala Ser Arg Thr Ile Phe Leu Gly Gly Ile
 50 55 60

TTA ATC ACT TTA GGA CAC GTC GCT TTA GCA ACA CCA TTT GGT TTA TCT 240
 Leu Ile Thr Leu Gly His Val Ala Leu Ala Thr Pro Phe Gly Leu Ser
 65 70 75 80

TCA CTC TTC GTG GCA TTA TTC TTG ATT ATC TTA GGA ACA GGG ATG CTT 288
 Ser Leu Phe Val Ala Leu Phe Leu Ile Ile Leu Gly Thr Gly Met Leu
 85 90 95

AAA CCC AAT ATT TCT AAC ATG GTT GGG CAT CTA TAT TCA AAA GAT GAC 336
 Lys Pro Asn Ile Ser Asn Met Val Gly His Leu Tyr Ser Lys Asp Asp
 100 105 110

TCA CGT CGT GAT ACT GGA TTT AAT ATC TTT GTA GTC GGA ATT AAT ATG Ser Arg Arg Asp Thr Gly Phe Asn Ile Phe Val Val Gly Ile Asn Met 115 120 125	384
GGT TCT CTG ATT GCT CCA TTG ATT GTT GGG ACA GTT GGA CAA GGC GTG Gly Ser Leu Ile Ala Pro Leu Ile Val Gly Thr Val Gly Gln Gly Val 130 135 140	432
AAC TAC CAC TTA GGT TTC TCA CTT GCC GCA ATC GGA ATG ATT TTT GCA Asn Tyr His Leu Gly Phe Ser Leu Ala Ala Ile Gly Met Ile Phe Ala 145 150 155 160	480
TTA TTT GCT TAT TGG TAT GGA CGT CTT CGT CAT TTC CCA GAA ATT GGA Leu Phe Ala Tyr Trp Tyr Gly Arg Leu Arg His Phe Pro Glu Ile Gly 165 170 175	528
CGT GAA CCA TCT AAT CCA ATG GAT GCA AAA GCA AAA CGT AAT TTT ATT Arg Glu Pro Ser Asn Pro Met Asp Ala Lys Ala Lys Arg Asn Phe Ile 180 185 190	576
ATT ACA TTA ACG ATT GTT CTT ATC GTT GCT TTA ATC GGA TTT TTC TTA Ile Thr Leu Thr Ile Val Leu Ile Val Ala Leu Ile Gly Phe Phe Leu 195 200 205	624
ATT TAT CAA GCA AGT CCT GCG AAT TTC ATC AAT AAT TTC ATT AAC GTT Ile Tyr Gln Ala Ser Pro Ala Asn Phe Ile Asn Asn Phe Ile Asn Val 210 215 220	672
TTA TCA ATT ATC GGT ATT GTT GTT CCA ATT ATT TAT TTC GTA ATG ATG Leu Ser Ile Ile Gly Ile Val Val Pro Ile Ile Tyr Phe Val Met Met 225 230 235 240	720
TTT ACC TCT AAA AAG GTA GAA TCA GAC GAA CGT CGT AAA TTA ACG GCT Phe Thr Ser Lys Lys Val Glu Ser Asp Glu Arg Arg Lys Leu Thr Ala 245 250 255	768
TAT ATT CCT TTG TTC CTT TCT GCT ATT GTC TTT TGG GCA ATT GAA GAA Tyr Ile Pro Leu Phe Leu Ser Ala Ile Val Phe Trp Ala Ile Glu Glu 260 265 270	816
CAA AGT TCT ACG ATT ATT GCG GTT TGG GGA GAA TCA CGT TCT AAC TTA Gln Ser Ser Thr Ile Ile Ala Val Trp Gly Glu Ser Arg Ser Asn Leu 275 280 285	864
AAT CCT ACT TGG TTT GGA TTT ACT TTC CAT ATT GAC CCA TCT TGG TAC Asn Pro Thr Trp Phe Gly Phe Thr Phe His Ile Asp Pro Ser Trp Tyr 290 295 300	912
CAA TTG TTG AAC CCA CTC TTC ATC GTT CTC TTG TCA CCT ATC TTT GTA Gln Leu Leu Asn Pro Leu Phe Ile Val Leu Leu Ser Pro Ile Phe Val 305 310 315 320	960
CGA ATT TGG AAC AAA TTA GGA GAT CGT CAA CCA TCA ACC ATC GTT AAA Arg Ile Trp Asn Lys Leu Gly Asp Arg Gln Pro Ser Thr Ile Val Lys 325 330 335	1008
TTT GGT CTT GGA CTG ATG TTG ACC GGA GCT TCT TAT TTG ATT ATG ACA Phe Gly Leu Gly Leu Met Leu Thr Gly Ala Ser Tyr Leu Ile Met Thr 340 345 350	1056
CTT CCT GGA CTC TTG AAT GGG ACT TCT GGA CGT GCG AGT GCT CTT TGG Leu Pro Gly Leu Leu Asn Gly Thr Ser Gly Arg Ala Ser Ala Leu Trp 355 360 365	1104

CTA	GTA	TTG	ATG	TTT	GCT	GTT	CAA	ATG	GCA	GGT	GAA	TTA	CTT	GTT	TCA	1152
Leu	Val	Leu	Met	Phe	Ala	Val	Gln	Met	Ala	Gly	Glu	Leu	Leu	Val	Ser	
370						375					380					
CCA	GTT	GGT	TTA	TCA	GTT	TCA	ACA	AAA	TTA	GCG	CCA	GTA	GCA	TTC	CAA	1200
Pro	Val	Gly	Leu	Ser	Val	Ser	Thr	Lys	Leu	Ala	Pro	Val	Ala	Phe	Gln	
385					390					395					400	
TCT	CAA	ATG	ATG	GCA	ATG	TGG	TTC	TTG	GCA	GAC	TCA	ACT	TCA	CAA	GCG	1248
Ser	Gln	Met	Met	Ala	Met	Trp	Phe	Leu	Ala	Asp	Ser	Thr	Ser	Gln	Ala	
				405					410					415		
ATT	AAT	GCC	CAA	ATT	ACA	CCT	ATC	TTT	AAA	GCA	GCA	ACA	GAA	GTT	CAC	1296
Ile	Asn	Ala	Gln	Ile	Thr	Pro	Ile	Phe	Lys	Ala	Ala	Thr	Glu	Val	His	
			420					425					430			
TTC	TTT	GCA	ATT	ACA	GGG	ATT	ATC	GGT	ATT	ATC	GTT	GGA	ATC	ATC	CTC	1344
Phe	Phe	Ala	Ile	Thr	Gly	Ile	Ile	Gly	Ile	Ile	Val	Gly	Ile	Ile	Leu	
		435					440					445				
CTT	ATT	ATC	AAA	AAA	CCT	ATT	TTG	AAA	TTA	ATG	GGA	GAT	GTT	CGT		1389
Leu	Ile	Ile	Lys	Lys	Pro	Ile	Leu	Lys	Leu	Met	Gly	Asp	Val	Arg		
450						455					460					

INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID No. 3

i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SÉQUENCE ID No. 3

A) LONGUEUR :

B) TYPE : ADN

C) NOMBRE DE BRIN : double

D) CONFIGURATION : linéaire

xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE ID No. 3

ATG	GAA	AAT	GTT	GCC	TTA	ACT	CAC	TTT	GTA	GAT	AAT	GCT	TTA	CGT	GCC	48
Met	Glu	Asn	Val	Ala	Leu	Thr	His	Phe	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Arg	Ala	
1				5					10					15		
AAC	TTT	ATC	ATG	CTT	CAC	GAC	ATC	GAC	TAT	ATG	GTT	GAT	GAA	AAC	CAA	96
Asn	Phe	Ile	Met	Leu	His	Asp	Ile	Asp	Tyr	Met	Val	Asp	Glu	Asn	Gln	
			20					25					30			
GAA	GTT	TTG	ATT	ATT	GAC	CAA	TTT	ACT	GGA	CGT	ACG	ATG	CCT	GGA	CGT	144
Glu	Val	Leu	Ile	Ile	Asp	Gln	Phe	Thr	Gly	Arg	Thr	Met	Pro	Gly	Arg	
		35					40					45				
CGC	TAT	TCT	GAT	GGT	CTT	CAC	CAA	GCA	ATT	GAA	GCT	AAA	GAA	GCT	GTG	192
Arg	Tyr	Ser	Asp	Gly	Leu	His	Gln	Ala	Ile	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Val	
	50					55					60					
CCA	ATT	CAA	GAT	GAA	TCA	AAA	ACA	ATG	GCT	TCA	ATT	ACG	ATT	CAA	AAC	240
Pro	Ile	Gln	Asp	Glu	Ser	Lys	Thr	Met	Ala	Ser	Ile	Thr	Ile	Gln	Asn	
65					70					75					80	
TAC	TTC	CGG	ATG	TAT	AAA	AAA	CTG	TCA	GGG	ATG	ACA	GGG	ACT	GCT	AAA	288
Tyr	Phe	Arg	Met	Tyr	Lys	Lys	Leu	Ser	Gly	Met	Thr	Gly	Thr	Ala	Lys	
				85					90					95		
ACC	GAA	GAA	GAA	GAA	TTC	CGT	GAG	ATT	TAT	AAC	ATT	CAA	ATC	ACA	CCA	336
Thr	Glu	Glu	Glu	Glu	Phe	Arg	Glu	Ile	Tyr	Asn	Ile	Gln	Ile	Thr	Pro	

100				105				110								
ATT	CCA	ACC	AAC	CGT	CCT	GTT	CAA	CGT	TTA	GAT	CAT	CCA	GAT	TTA	CTT	384
Ile	Pro	Thr	Asn	Arg	Pro	Val	Gln	Arg	Leu	Asp	His	Pro	Asp	Leu	Leu	
		115					120					125				
TAC	CCA	ACT	TTG	GAA	GCT	AAA	TTT	AAA	GCA	GTT	ATT	GAT	GAT	ATT	AAA	432
Tyr	Pro	Thr	Leu	Glu	Ala	Lys	Phe	Lys	Ala	Val	Ile	Asp	Asp	Ile	Lys	
		130				135					140					
CGT	CGT	CAT	GCT	GAA	GGT	CAA	CCA	ATA	TTG	ATT	GGT	ACT	GTT	GCT	GTC	480
Arg	Arg	His	Ala	Glu	Gly	Gln	Pro	Ile	Leu	Ile	Gly	Thr	Val	Ala	Val	
145					150					155					160	
GAA	ACT	TCC	GAA	TTG	ATT	TCT	AAG	AAA	TTG	GTT	GAA	GCA	AAA	ATT	CCT	528
Glu	Thr	Ser	Glu	Leu	Ile	Ser	Lys	Lys	Leu	Val	Glu	Ala	Lys	Ile	Pro	
			165						170					175		
CAC	GAA	GTT	TTG	AAT	GCG	AAA	AAT	CAC	TTC	CGT	GAA	GCA	CAA	ATC	ATC	576
His	Glu	Val	Leu	Asn	Ala	Lys	Asn	His	Phe	Arg	Glu	Ala	Gln	Ile	Ile	
			180					185					190			
ATG	AAT	GCG	GGT	CAA	CAA	GGA	GCA	GTA	ACG	ATT	GCG	ACC	AAC	ATG	GCC	624
Met	Asn	Ala	Gly	Gln	Gln	Gly	Ala	Val	Thr	Ile	Ala	Thr	Asn	Met	Ala	
		195					200					205				
GGT	CGT	GGG	ACT	GAT	ATC	AAG	CTT	GGG	CCT	GGT	GTA	ATT	GAT	CAT	GTA	672
Gly	Arg	Gly	Thr	Asp	Ile	Lys	Leu	Gly	Pro	Gly	Val	Ile	Asp	His	Val	
	210					215				220						
GAC	CCT	GAA	TTC	CGA	GGT	CTT	GCT	GTT	ATT	GGT	ACT	GAG	CGT	CAT	GAA	720
Asp	Pro	Glu	Phe	Arg	Gly	Leu	Ala	Val	Ile	Gly	Thr	Glu	Arg	His	Glu	
225					230					235					240	
TCT	CGT	CGT	ATT	GAT	AAT	CAA	TTA	CGT	GGT	CGT	TCT	GGA	CGT	CAA	GGT	768
Ser	Arg	Arg	Ile	Asp	Asn	Gln	Leu	Arg	Gly	Arg	Ser	Gly	Arg	Gln	Gly	
				245					250					255		
GAC	CCA	GGG	GTT	TCA	CAA	TTC	TAT	CTT	TCT	CTT	GAA	GAT	GAA	TTA	ATG	816
Asp	Pro	Gly	Val	Ser	Gln	Phe	Tyr	Leu	Ser	Leu	Glu	Asp	Glu	Leu	Met	
			260					265					270			
AAA	CGT	TTT	GGT	TCG	GAA	CGT	GTT	TCA	GCT	TTC	CTA	GAT	AGA	ATG	CGT	864
Lys	Arg	Phe	Gly	Ser	Glu	Arg	Val	Ser	Ala	Phe	Leu	Asp	Arg	Met	Arg	
		275					280					285				
ATT	TCT	GGT	GAA	GAT	GCT	GTC	ATC	AAA	TCT	GGC	TTG	ATT	ACT	CGT	CAG	912
Ile	Ser	Gly	Glu	Asp	Ala	Val	Ile	Lys	Ser	Gly	Leu	Ile	Thr	Arg	Gln	
	290					295					300					
ATT	GAA	AGT	TCA	CAA	AAA	CGT	GTC	GAA	GGA	AAT	AAC	TAC	GAT	TCT	CGT	960
Ile	Glu	Ser	Ser	Gln	Lys	Arg	Val	Glu	Gly	Asn	Asn	Tyr	Asp	Ser	Arg	
305					310					315					320	
AAA	CAA	GTC	TTG	CAA	TAT	GAT	GAT	GTC	ATC	CGT	GAG	CAA	CGT	GAA	GTT	1008
Lys	Gln	Val	Leu	Gln	Tyr	Asp	Asp	Val	Ile	Arg	Glu	Gln	Arg	Glu	Val	
				325					330					335		
ATT	TAT	GCG	CAA	CGT	CAG	GAA	GTT	ATC	TTG	GCT	ACA	GAA	GAT	ATG	ACT	1056
Ile	Tyr	Ala	Gln	Arg	Gln	Glu	Val	Ile	Leu	Ala	Thr	Glu	Asp	Met	Thr	
		340						345					350			
CCT	GTT	TTG	ATG	GGC	ATG	TTC	AAG	CGA	ACA	ATT	GAT	CGT	CAA	GTG	GAT	1104

Pro	Val	Leu	Met	Gly	Met	Phe	Lys	Arg	Thr	Ile	Asp	Arg	Gln	Val	Asp	
		355					360					365				
GGT	CAT	GAA	CTT	GCA	GGA	AGT	CTT	AAA	GAT	GAA	GAA	AAT	GTC	AAA	AAT	1152
Gly	His	Glu	Leu	Ala	Gly	Ser	Leu	Lys	Asp	Glu	Glu	Asn	Val	Lys	Asn	
		370				375					380					
CTC	TTG	CAA	ACA	TTA	CAC	AAT	ACA	ATG	TTG	CCA	GAA	GAT	GGC	ATT	GAA	1200
Leu	Leu	Gln	Thr	Leu	His	Asn	Thr	Met	Leu	Pro	Glu	Asp	Gly	Ile	Glu	
		385				390				395					400	
TTG	TCT	GAA	CTG	ACA	GGT	TTG	TCA	GTA	CAA	GCA	ATG	AAA	GAT	TTG	ATT	1248
Leu	Ser	Glu	Leu	Thr	Gly	Leu	Ser	Val	Gln	Ala	Met	Lys	Asp	Leu	Ile	
				405					410						415	
TTT	GAT	AAA	GTC	AAA	GCT	CGT	TAT	GCT	TCA	CAA	ATG	GAA	AAA	TTA	TCT	1296
Phe	Asp	Lys	Val	Lys	Ala	Arg	Tyr	Ala	Ser	Gln	Met	Glu	Lys	Leu	Ser	
			420					425						430		
GAC	CCA	GAA	CGT	CAG	TTG	GAA	TTC	CAA	CGT	GCA	GTT	ATC	TTA	CGA	GTT	1344
Asp	Pro	Glu	Arg	Gln	Leu	Glu	Phe	Gln	Arg	Ala	Val	Ile	Leu	Arg	Val	
		435					440					445				
GTT	GAT	AAT	AAC	TGG	TCA	GAA	CAC	ATT	GAT	GCG	CTT	GAC	CAA	ATG	CGT	1392
Val	Asp	Asn	Asn	Trp	Ser	Glu	His	Ile	Asp	Ala	Leu	Asp	Gln	Met	Arg	
		450				455					460					
CAA	TCA	GTA	GGA	CTT	CGT	GGT	TAT	GCC	CAA	AAT	AAC	CCT	ATT	GTT	GAA	1440
Gln	Ser	Val	Gly	Leu	Arg	Gly	Tyr	Ala	Gln	Asn	Asn	Pro	Ile	Val	Glu	
		465				470				475					480	
TAT	CAA	GAA	GAA	TCA	TAT	AAA	ATG	TAC	AAT	AAT	ATG	ATT	GGT	GCG	ATT	1488
Tyr	Gln	Glu	Glu	Ser	Tyr	Lys	Met	Tyr	Asn	Asn	Met	Ile	Gly	Ala	Ile	
				485					490					495		
GAA	TTT	GAA	GTG	ACT	CGT	TTG	ATG	ATG	AAA	GCT	CAA	ATT	CAA	CCA	CAA	1536
Glu	Phe	Glu	Val	Thr	Arg	Leu	Met	Met	Lys	Ala	Gln	Ile	Gln	Pro	Gln	
			500					505					510			
ACG	GCA	ATC	CGT	CAG	GAA	GCG	CCA	AGA	ATG	ACA	ACC	ACA	GCT	TCA	CAA	1584
Thr	Ala	Ile	Arg	Gln	Glu	Ala	Pro	Arg	Met	Thr	Thr	Thr	Ala	Ser	Gln	
		515					520						525			
GAA	AAT	ATT	ACA	AAT	GTT	GAT	ACT	GAA	CAT	TCT	GTC	AGT	GAA	GAA	ATT	1632
Glu	Asn	Ile	Thr	Asn	Val	Asp	Thr	Glu	His	Ser	Val	Ser	Glu	Glu	Ile	
		530				535					540					
TCA	TTT	GAA	AAT	GTT	GGT	CGT	AAC	GAC	CTT	TGT	CCT	TGT	GGT	TCT	GGT	1680
Ser	Phe	Glu	Asn	Val	Gly	Arg	Asn	Asp	Leu	Cys	Pro	Cys	Gly	Ser	Gly	
		545			550					555					560	
AAG	AAG	TTT	AAA	AAT	TGT	CAC	GGA	CGT	ACA	CAT	ATT	GCC				1719
Lys	Lys	Phe	Lys	Asn	Cys	His	Gly	Arg	Thr	His	Ile	Ala				
				565					570			573				

INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID No. 4

i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SÉQUENCE ID No. 4

A) LONGUEUR :

B) TYPE : ADN

C) NOMBRE DE BRIN : double

D) CONFIGURATION : linéaire

xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE ID No. 4

ATG TTT TTT AAG ACG CTT AAG GAA GCC TTT AAG GTC AAA GAC GTC CGA	48
Met Phe Phe Lys Thr Leu Lys Glu Ala Phe Lys Val Lys Asp Val Arg	
1 5 10 15	
GCA AGA ATT CTC TTT ACG ATT TTC ATC CTT TTT GTT TTC CGC TTA GGT	96
Ala Arg Ile Leu Phe Thr Ile Phe Ile Leu Phe Val Phe Arg Leu Gly	
20 25 30	
GCT CAT ATT ACG GTA CCT GGC GTC AAC GTT CAA AAC TTA ACA GAA GTA	144
Ala His Ile Thr Val Pro Gly Val Asn Val Gln Asn Leu Thr Glu Val	
35 40 45	
AGT AAT CTT CCT TTC TTG AAC ATG ATG AAC TTG GTT TCT GGT AAT GCC	192
Ser Asn Leu Pro Phe Leu Asn Met Met Asn Leu Val Ser Gly Asn Ala	
50 55 60	
ATG CAA AAC TAC TCA CTC TTT GCA ATG GGA GTT TCG CCT TAT ATC ACT	240
Met Gln Asn Tyr Ser Leu Phe Ala Met Gly Val Ser Pro Tyr Ile Thr	
65 70 75 80	
GCT TCA ATC ATT GTT CAA TTG TTG CAA ATG GAT ATT TTA CCA AAA TTT	288
Ala Ser Ile Ile Val Gln Leu Leu Gln Met Asp Ile Leu Pro Lys Phe	
85 90 95	
GTT GAG TGG TCA AAA CAA GGG GAA ATT GGA CGT CGT AAA CTG AAT CAA	336
Val Glu Trp Ser Lys Gln Gly Glu Ile Gly Arg Arg Lys Leu Asn Gln	
100 105 110	
GCG ACA CGT TAC ATT ACC TTA GTG CTT GCT ATG GCA CAA TCT ATC GGG	384
Ala Thr Arg Tyr Ile Thr Leu Val Leu Ala Met Ala Gln Ser Ile Gly	
115 120 125	
ATT ACT GCT GGT TTC CAA GCC ATG AGC TCG TTA AAT ATT GTG CAA AAT	432
Ile Thr Ala Gly Phe Gln Ala Met Ser Ser Leu Asn Ile Val Gln Asn	
130 135 140	
CCA AAT TGG CAA AGC TAT TTG ATG ATT GGT GCA ATT TTG ACC ACT GGT	480
Pro Asn Trp Gln Ser Tyr Leu Met Ile Gly Ala Ile Leu Thr Thr Gly	
145 150 155 160	
TCA ATG GTT GTC ACT TGG ATG GGT GAA CAA ATT AAT GAC CAA GGT TTT	528
Ser Met Val Val Thr Trp Met Gly Glu Gln Ile Asn Asp Gln Gly Phe	
165 170 175	
GGC TCA GGT GTT TCA GTA ATC ATC TTT GCT GGG ATT GTC TCT AGT ATT	576
Gly Ser Gly Val Ser Val Ile Ile Phe Ala Gly Ile Val Ser Ser Ile	
180 185 190	
CCA TCA GCC ATC AAA TCT GTT TAT GAT GAA AAA TTC TTA AAC GTA AGA	624
Pro Ser Ala Ile Lys Ser Val Tyr Asp Glu Lys Phe Leu Asn Val Arg	
195 200 205	

CCA TCT GAA ATT CCT ATG TCT TGG ATA TTT GTT ATT GGA TTG ATT TTG Pro Ser Glu Ile Pro Met Ser Trp Ile Phe Val Ile Gly Leu Ile Leu 210 215 220	672
TCA GCA ATT GTC ATT ATT TAT GTT ACA ACA TTT GTT CAA CAA GCG GAA Ser Ala Ile Val Ile Ile Tyr Val Thr Thr Phe Val Gln Gln Ala Glu 225 230 235 240	720
CGT AAA GTA CCA ATT CAA TAC ACT AAG TTG ACT CAA GGC GCA CCA ACA Arg Lys Val Pro Ile Gln Tyr Thr Lys Leu Thr Gln Gly Ala Pro Thr 245 250 255	768
AGT TCG TAC TTT CCA CTT CGT GTC AAT CCA GCT GGT GTT ATC CCA GTT Ser Ser Tyr Phe Pro Leu Arg Val Asn Pro Ala Gly Val Ile Pro Val 260 265 270	816
ATC TTT GCT GGT TCA ATT ACA ACT GCT CCT GCT ACG ATC TTG CAA TTC Ile Phe Ala Gly Ser Ile Thr Thr Ala Pro Ala Thr Ile Leu Gln Phe 275 280 285	864
TTG CAA CGT TCA CAA GGT AGC AAT GTA GGT TGG TTA TCA ACC TTA CAA Leu Gln Arg Ser Gln Gly Ser Asn Val Gly Trp Leu Ser Thr Leu Gln 290 295 300	912
AAC GCC TTG TCA TAT ACG ACT TGG ACA GGA ATG CTC TTC TAC GCA TTA Asn Ala Leu Ser Tyr Thr Thr Trp Thr Gly Met Leu Phe Tyr Ala Leu 305 310 315 320	960
TTG ATT GTT CTC TTT ACT TTC TTC TAC TCA TTC GTT CAG GTC AAT CCT Leu Ile Val Leu Phe Thr Phe Phe Tyr Ser Phe Val Gln Val Asn Pro 325 330 335	1008
GAA AAG ATG GCT GAA AAC CTT CAA AAA CAA GGC TCT TAC ATT CCA TCT Glu Lys Met Ala Glu Asn Leu Gln Lys Gln Gly Ser Tyr Ile Pro Ser 340 345 350	1056
GTT CGT CCG GGT AAA GGA ACC GAA AAG TAT GTT TCT CGT CTC TTA ATG Val Arg Pro Gly Lys Gly Thr Glu Lys Tyr Val Ser Arg Leu Leu Met 355 360 365	1104
CGT CTT GCA ACG GTT GGT TCG CTC TTC CTT GGA TTG ATT TCA ATC ATT Arg Leu Ala Thr Val Gly Ser Leu Phe Leu Gly Leu Ile Ser Ile Ile 370 375 380	1152
CCA ATT GCG GCC CAA AAC GTT TGG GGA CTT CCA AAA ATC GTC GCT CTT Pro Ile Ala Ala Gln Asn Val Trp Gly Leu Pro Lys Ile Val Ala Leu 385 390 395 400	1200
GGA GGG ACA TCA TTA TTA ATC TTG ATT CAA GTT GCG ATT CAA GCA GTT Gly Gly Thr Ser Leu Leu Ile Leu Ile Gln Val Ala Ile Gln Ala Val 405 410 415	1248
AAA CAA CTT GAA GGA TAT TTA CTT AAA CGT AAA TAT GCA GGA TTT ATG Lys Gln Leu Glu Gly Tyr Leu Leu Lys Arg Lys Tyr Ala Gly Phe Met 420 425 430	1296
GAT AAT CCA CTT GAA ACA AAA Asp Asn Pro Leu Glu Thr Lys 435 439	1317

INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID NO:5

i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SÉQUENCE ID NO:5

A) LONGUEUR :

B) TYPE : ADN

C) NOMBRE DE BRIN : double

D) CONFIGURATION : linéaire

xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE ID NO:5

```

GTAATATTTT TATGAAAACA TTTGCAAATA TCGATTTGAA GTAGTATAAT AACTAAGTAA 60
TAATTTTAT TATAATCTTA TATAGGAGGT TACTCACATT GAGTATCGGA ATTGTTATTG 120
CGAGCC ATG GTG AAT TCG CCG CAG ATC AAA CAA TCT GGT TCT ATG ATT 168
    Met Val Asn Ser Pro Gln Ile Lys Gln Ser Gly Ser Met Ile
      1             5             10
TTC GGA GAG CAA GAA AAA GTA CAA GTT GTT ACT TTT ATG CCT AGC GAA 216
Phe Gly Glu Gln Glu Lys Val Gln Val Val Thr Phe Met Pro Ser Glu
  15             20             25             30
GGA CCA ACT GAT TTG CAT GCT AAA ATC GAA GCT GCC ATC GCA ACA TTT 264
Gly Pro Thr Asp Leu His Ala Lys Ile Glu Ala Ala Ile Ala Thr Phe
      35             40             45
GAT GCT GAA GAT GAA GTA CTT GTC CTT GCT GAC TTA TGG AGC GGT TCT 312
Asp Ala Glu Asp Glu Val Leu Val Leu Ala Asp Leu Trp Ser Gly Ser
      50             55             60
CCA TTT AAT CAA GCA AGT GCA GTG ATG GGT GAA AAT CCA GAG CGC AAG 360
Pro Phe Asn Gln Ala Ser Ala Val Met Gly Glu Asn Pro Glu Arg Lys
      65             70             75
ATT GCT ATC ATC ACA GGC CTC AAC CTG CCT ATG CTT ATC CAA GCC TAC 408
Ile Ala Ile Ile Thr Gly Leu Asn Leu Pro Met Leu Ile Gln Ala Tyr
      80             85             90
ACA GAA CGC ATG ATG GAT GCG TCT GCC GGG GTG GAT AAA GTC GTA GCA 456
Thr Glu Arg Met Met Asp Ala Ser Ala Gly Val Asp Lys Val Val Ala
      95             100             105             110
AAT ATT ATG AAA GAA GCC AAA GGC GGT ATT AAA GTA CTA CCT GAA GAA 504
Asn Ile Met Lys Glu Ala Lys Gly Gly Ile Lys Val Leu Pro Glu Glu
      115             120             125
CTT CAA CCT GCT GAA GAA ACT GCT GTT GCA GCT GCT CCG GCT GCT GTT 552
Leu Gln Pro Ala Glu Glu Thr Ala Val Ala Ala Ala Pro Ala Ala Val
      130             135             140
CAA GGT GCG ATT CCT GAA GGA ACA GTC ATC GGT GAT GGT AAA ATT AAA 600
Gln Gly Ala Ile Pro Glu Gly Thr Val Ile Gly Asp Gly Lys Ile Lys
      145             150             155
ATT AAC CTC GCT CGT ATT GAC TCA CGT TTG CTT CAC GGA CAA GTT GCA 648
Ile Asn Leu Ala Arg Ile Asp Ser Arg Leu Leu His Gly Gln Val Ala
      160             165             170
ACT GCT TGG ACT CCA GAC TCA AGA GCA AAC CGC ATC ATC GTT GTT TCT 696
Thr Ala Trp Thr Pro Asp Ser Arg Ala Asn Arg Ile Ile Val Val Ser
      175             180             185             190

```

GAC ACC GTT TCT AAA GAT GAA CTT CGT AAG AAG CTC ATT GAA CAA GCG Asp Thr Val Ser Lys Asp Glu Leu Arg Lys Lys Leu Ile Glu Gln Ala 195 200 205	744
GCT CCA ACT GGT GTA AAA GCT AAC GTT ATA CCA ATT AAG AAA ATG ATT Ala Pro Thr Gly Val Lys Ala Asn Val Ile Pro Ile Lys Lys Met Ile 210 215 220	792
GAA GTT GCT AAA GAC CCA CGT TTT GGT GAC ACT AAA GCC CTT CTT CTT Glu Val Ala Lys Asp Pro Arg Phe Gly Asp Thr Lys Ala Leu Leu Leu 225 230 235	840
TTC GAA ACG CCA CAA GAC GCT CTT GCA ACA ATC GAA GGT GGC GTA CCA Phe Glu Thr Pro Gln Asp Ala Leu Ala Thr Ile Glu Gly Gly Val Pro 240 245 250	888
ATT GAA ACA TTG AAC GTT GGT TCT ATG GCT CAC TCA ACT GGT AAA ACA Ile Glu Thr Leu Asn Val Gly Ser Met Ala His Ser Thr Gly Lys Thr 255 260 265 270	936
ATG CTC AAC AAA GTT CTT TCT ATG GAC AAA GAT GAC GTT GCT ACT TTT Met Leu Asn Lys Val Leu Ser Met Asp Lys Asp Asp Val Ala Thr Phe 275 280 285	984
GAA AAA TTG CGT GAC CTC GGA GTT AAA TTC GAC GTA CGT AAA GTT CCA Glu Lys Leu Arg Asp Leu Gly Val Lys Phe Asp Val Arg Lys Val Pro 290 295 300	1032
GCT GAC TCT AAA TCT GAC CTC TTT GGT TTG ATT AAC AAA GCT GAC GTA Ala Asp Ser Lys Ser Asp Leu Phe Gly Leu Ile Asn Lys Ala Asp Val 305 310 315	1080
CAA TAATCAGAAT ATGCTCGTAT GATATTCTGA TTAATAAAAT TGAATATTAG Gln	1133
GCAGCCAAAT AATTAAGGAG ATATAAAAAA C ATG GAA TAC GGT GTT TTA TCT Met Glu Tyr Gly Val Leu Ser 320 325	1185
GTA ATC TTG GTC ATT GTT GTT GCC TTC CTT GCT GGT CTT GAA GGT ATC Val Ile Leu Val Ile Val Val Ala Phe Leu Ala Gly Leu Glu Gly Ile 330 335 340	1233
CTT GAC CAA TGG CAA TTC CAC CAA CCA ATT ATC GCG TGC TCG CTC ATC Leu Asp Gln Trp Gln Phe His Gln Pro Ile Ile Ala Cys Ser Leu Ile 345 350 355	1281
GGT ATT GTT ACC GGT CAT GCT TCT GCA GGG ATT ATC CTC GGT GGT TCA Gly Ile Val Thr Gly His Ala Ser Ala Gly Ile Ile Leu Gly Gly Ser 360 365 370	1329
CTT CAA TTG ATC GCT CTT GGT TGG GCT AAC GTT GGT GCC GCT GTC GCA Leu Gln Leu Ile Ala Leu Gly Trp Ala Asn Val Gly Ala Ala Val Ala 375 380 385 390	1377
CCC GAT GCT GCC CTT GCC TCT ATC GCA TCA TCT ATC TTG ATG GTT CAA Pro Asp Ala Ala Leu Ala Ser Ile Ala Ser Ser Ile Leu Met Val Gln 395 400 405	1425
TCA AAT AAC TTT GAC TTG ACT CAC ATC ATG GGT ACT ATC GTT CCT GCT Ser Asn Asn Phe Asp Leu Thr His Ile Met Gly Thr Ile Val Pro Ala 410 415 420	1473

GCT ATC TTG CTT GCA ACT GCT GGT CTT GTA TTG ACT ACT CTT GTA CGT	1521
Ala Ile Leu Leu Ala Thr Ala Gly Leu Val Leu Thr Thr Leu Val Arg	
425 430 435	
ATG CTT TCA GTT GTG CTC GTT CAC CAA GCT GAC CGT GCT GCT GAA AAT	1569
Met Leu Ser Val Val Leu Val His Gln Ala Asp Arg Ala Ala Glu Asn	
440 445 450	
GGT TCA TAC TCA GGT GTT GAA ATG TGG CAC TTC ATC GCG CTT ATC TGT	1617
Gly Ser Tyr Ser Gly Val Glu Met Trp His Phe Ile Ala Leu Ile Cys	
455 460 465 470	
CAA GGT TTG CGT ATT GCT ATC CCT GCT GGA CTT CTT TTG GTT ATC TCA	1665
Gln Gly Leu Arg Ile Ala Ile Pro Ala Gly Leu Leu Leu Val Ile Ser	
475 480 485	
CCA GAT GCT ATC CAA AAA GCA CTT GCT GCT ATT CCT CCA GTT ATC TCT	1713
Pro Asp Ala Ile Gln Lys Ala Leu Ala Ala Ile Pro Pro Val Ile Ser	
490 495 500	
GGC GGT CTT GCT GTC GGT GGT GGG ATG GTT GTT GCC GTT GGT TAT GCA	1761
Gly Gly Leu Ala Val Gly Gly Gly Met Val Val Ala Val Gly Tyr Ala	
505 510 515	
ATG GTT ATC AAC CTT ATG GCT ACT CGT GAA GTA TGG CCA TTC TTC TTC	1809
Met Val Ile Asn Leu Met Ala Thr Arg Glu Val Trp Pro Phe Phe Phe	
520 525 530	
CTT GGT TTC GCT CTC GCA CCA ATC TCT GAA TTA ACA TTG ATT GCA ACT	1857
Leu Gly Phe Ala Leu Ala Pro Ile Ser Glu Leu Thr Leu Ile Ala Thr	
535 540 545 550	
GGT GTC CTC GGT GTT GTT ATC GCT ATC GTT TAC CTT AAC CTC CAA GCT	1905
Gly Val Leu Gly Val Val Ile Ala Ile Val Tyr Leu Asn Leu Gln Ala	
555 560 565	
TCT GGT GGT TCT GGA AAT GGT ACT GCA TCT TCA TCA GGT GAC CCA ATT	1953
Ser Gly Gly Ser Gly Asn Gly Thr Ala Ser Ser Ser Gly Asp Pro Ile	
570 575 580	
GGC GAC ATC TTG AAC GAC TAC TAAGAAAGGA GGATCTAAAA A ATG TCT GAA	2004
Gly Asp Ile Leu Asn Asp Tyr Met Ser Glu	
585 590	
AAT AAA GTA ACT CTT GAT AAG AAA ATC CGT CGT AGC GTT ATG TGG CGT	2052
Asn Lys Val Thr Leu Asp Lys Lys Ile Arg Arg Ser Val Met Trp Arg	
595 600 605	
TCA ATG TTC CTC CAA GGT TCT TGG AAC TAC GAA CGT ATG CAA AAT GGT	2100
Ser Met Phe Leu Gln Gly Ser Trp Asn Tyr Glu Arg Met Gln Asn Gly	
610 615 620	
GGT TGG GCT TAC TCG CTC ATT CCA GCA TTG AAA AAA CTC TAC CCT TCT	2148
Gly Trp Ala Tyr Ser Leu Ile Pro Ala Leu Lys Lys Leu Tyr Pro Ser	
625 630 635 640	
GGC GAA GAA GCT AAA GAA GCT TTG AAA CGT CAC TTG GAA TTC TTT AAT	2196
Gly Glu Glu Ala Lys Glu Ala Leu Lys Arg His Leu Glu Phe Phe Asn	
645 650 655	

ACT	CAC	CCA	TAC	GTT	GCC	GCT	CCT	ATC	ATC	GGT	GTA	ACT	CTT	GCC	CTT	2244
Thr	His	Pro	Tyr	Val	Ala	Ala	Pro	Ile	Ile	Gly	Val	Thr	Leu	Ala	Leu	
			660					665					670			
GAA	GAA	GAA	CGT	GCT	AAC	GGT	GCT	GAT	ATC	GAT	GAT	GCC	GCT	ATT	CAA	2292
Glu	Glu	Glu	Arg	Ala	Asn	Gly	Ala	Asp	Ile	Asp	Asp	Ala	Ala	Ile	Gln	
			675				680					685				
GGG	GTT	AAA	GTT	GGT	ATG	ATG	GGT	CCT	CTT	GCC	GGT	ATC	GGT	GAC	CCT	2340
Gly	Val	Lys	Val	Gly	Met	Met	Gly	Pro	Leu	Ala	Gly	Ile	Gly	Asp	Pro	
			690				695					700				
GTC	TTC	TGG	TTT	ACA	GTA	CGT	CCT	ATC	GTT	GGT	GCG	ATT	GCA	GCT	TCA	2388
Val	Phe	Trp	Phe	Thr	Val	Arg	Pro	Ile	Val	Gly	Ala	Ile	Ala	Ala	Ser	
					710					715					720	
TTG	GCT	ACT	GGT	GGA	TCA	ATT	ATC	GCT	CCA	CTC	TTC	TTC	TTC	ATC	GTG	2436
Leu	Ala	Thr	Gly	Gly	Ser	Ile	Ile	Ala	Pro	Leu	Phe	Phe	Phe	Ile	Val	
					725				730					735		
TGG	AAC	GCT	ATC	CGT	ATC	GCT	TTC	TTG	TGG	TAC	ACT	CAA	GAA	TTT	GGT	2484
Trp	Asn	Ala	Ile	Arg	Ile	Ala	Phe	Leu	Trp	Tyr	Thr	Gln	Glu	Phe	Gly	
				740				745					750			
TAT	AAA	TCA	GGT	TCT	GCA	ATC	ACT	AAA	GAC	CTT	GGT	GGA	GGA	CTT	CTC	2532
Tyr	Lys	Ser	Gly	Ser	Ala	Ile	Thr	Lys	Asp	Leu	Gly	Gly	Gly	Leu	Leu	
			755				760					765				
CAA	ACT	GTT	ACT	AAA	GGT	GCA	TCT	ATC	CTT	GGT	ATG	TTC	GTC	CTT	GGT	2580
Gln	Thr	Val	Thr	Lys	Gly	Ala	Ser	Ile	Leu	Gly	Met	Phe	Val	Leu	Gly	
							775				780					
GTA	TTG	ATT	CAA	CGT	TGG	GTA	ACA	ATT	AAC	TTT	AAT	GGT	CCT	AAC	GCT	2628
Val	Leu	Ile	Gln	Arg	Trp	Val	Thr	Ile	Asn	Phe	Asn	Gly	Pro	Asn	Ala	
					790					795					800	
GTT	GTT	TCA	AAA	ATT	CCT	TTA	CAA	AAA	GGT	GCT	TAT	CTA	GAA	TTC	CCT	2676
Val	Val	Ser	Lys	Ile	Pro	Leu	Gln	Lys	Gly	Ala	Tyr	Leu	Glu	Phe	Pro	
				805					810					815		
AAA	GGT	TCT	GTA	TCT	GGT	ACA	CAA	CTT	CAT	GAT	ATT	CTT	GGT	CAA	GTT	2724
Lys	Gly	Ser	Val	Ser	Gly	Thr	Gln	Leu	His	Asp	Ile	Leu	Gly	Gln	Val	
				820				825					830			
GGT	AAC	AAA	CTT	TCT	CTT	GAT	CCT	ACA	AAA	GTA	ACT	TAC	CTT	CAA	GAT	2772
Gly	Asn	Lys	Leu	Ser	Leu	Asp	Pro	Thr	Lys	Val	Thr	Tyr	Leu	Gln	Asp	
				835			840					845				
AAC	TTG	AAT	CAA	TTG	ATT	CCT	GGT	CTT	GCT	GGT	TTG	CTT	ATC	ACA	TTC	2820
Asn	Leu	Asn	Gln	Leu	Ile	Pro	Gly	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Ile	Thr	Phe	
						855					860					
CTT	TGC	ATG	TGG	TTG	CTT	AAG	AAA	AAA	GTT	TCT	CCA	ATC	GTT	ATT	ATC	2868
Leu	Cys	Met	Trp	Leu	Leu	Lys	Lys	Lys	Val	Ser	Pro	Ile	Val	Ile	Ile	
					870					875					880	
TTT	GGT	CTC	TTC	GTC	GTG	GGT	ATC	CTC	GGT	CGA	TGG	GCT	CAA	ATC	ATG	2916
Phe	Gly	Leu	Phe	Val	Val	Gly	Ile	Leu	Gly	Arg	Trp	Ala	Gln	Ile	Met	
					885				890					895		

.INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID NO:6

i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SÉQUENCE ID NO:6

A) LONGUEUR :

B) TYPE : ADN

C) NOMBRE DE BRIN : double

D) CONFIGURATION : linéaire

xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE ID NO:6

```

GACTTTATTA TCTTTCAAAA GTTGATAGGT GTTTTTATTT CATCTGTTAA AATTATTGTT 60
TACTTCTAGT TCAGAAGTAA GATTTTTTAT AAAATCTGTT AAGGAAATTT CTTAGTAACT 120
TAAATCTTCT CCGTTTGTCT AAATCACTTT TTTGTACCAG TCAAAGCCCC GTTTTTTGAT 180
ACGTTTATAA TCTTTATCTA TATAACAAA ACCATAACGT TTTTCAAAAC CTTACAGAGT 240
AGAGTAAAGG TCCGTTGCAG ACCATGTAAG ATAACCAATC ATTTCTACTC CCTCTTCAAC 300
CGTTCTTTC ATACGAGCAA TATGGTCTGC TAAATACTTA ATTCTGTAAT CATCATTAAC 360
CGTTCCG                                     367

```

INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID NO:7

i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SÉQUENCE ID NO:7

A) LONGUEUR :

B) TYPE : ADN

C) NOMBRE DE BRIN : double

D) CONFIGURATION : linéaire

xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE ID NO:7

```

TTCATTTTAT ACAAAGGAGT CCCA ATG ATA AAA GCA ATT GCC TTA GAA AAT      51
                Met Ile Lys Ala Ile Ala Leu Glu Asn
                  1                      5

GTT TGG TTA AAT TTT TCA GAT GAA ACA AAA GCG GCT TTC AAG AAA AAT      99
Val Trp Leu Asn Phe Ser Asp Glu Thr Lys Ala Ala Phe Lys Lys Asn
  10                15                20                25

AAA GCT TAC CAG TTT CAA TTT AAA AAA GAA GAA GAG CTG ACA GAA TCA      147
Lys Ala Tyr Gln Phe Gln Phe Lys Lys Glu Glu Glu Leu Thr Glu Ser
                30                35                40

GAT TTT CTG GAA ACA GAA GTA TTA GTT GGT CTG CCA AAG CCT GAT TTA      195
Asp Phe Leu Glu Thr Glu Val Leu Val Gly Leu Pro Lys Pro Asp Leu
                45                50                55

TTA GCA AAA TAT AAA AAT TTA AAA TGG CTC CAA CTT TTA TCA GCT GGG      243
Leu Ala Lys Tyr Lys Asn Leu Lys Trp Leu Gln Leu Leu Ser Ala Gly
                60                65                70

ACC AAT GGT TAT ACT CAA GGA GCA AAT TTT CCT CAA GAG GTA GTT TTG      291
Thr Asn Gly Tyr Thr Gln Gly Ala Asn Phe Pro Gln Glu Val Val Leu
  75                80                85

ACA AAT GCA ACA GGA ACT TAT GGA CTT ACG ATT TCT GAG CAT TTA CTA      339
Thr Asn Ala Thr Gly Thr Tyr Gly Leu Thr Ile Ser Glu His Leu Leu
  90                95                100                105

ACA ATG GCT TTC GTT CTT CTA AGA AAA TTT GAC CTT TAT CAA AAA CAA      387
Thr Met Ala Phe Val Leu Leu Arg Lys Phe Asp Leu Tyr Gln Lys Gln
                110                115                120

```

CAA	GAA	AAA	GAA	ATC	TGG	GAA	AAT	ATT	GGT	CAG	ATT	CAA	TCT	ATT	TAT	435
Gln	Glu	Lys	Glu	Ile	Trp	Glu	Asn	Ile	Gly	Gln	Ile	Gln	Ser	Ile	Tyr	
			125					130					135			
GGC	TCA	ACA	GTA	TTG	GTT	CAT	GGT	TTA	GGT	GAT	ATT	GGA	AGT	CAC	TTT	483
Gly	Ser	Thr	Val	Leu	Val	His	Gly	Leu	Gly	Asp	Ile	Gly	Ser	His	Phe	
		140					145					150				
GCA	CAA	AAG	ATT	CAA	GCT	TTG	GGA	GGT	CAT	GTC	ATT	GCA	GTC	AAA	CGA	531
Ala	Gln	Lys	Ile	Gln	Ala	Leu	Gly	Gly	His	Val	Ile	Ala	Val	Lys	Arg	
		155				160					165					
ACT	GTT	TAT	GGT	GAT	GAA	GAA	TTT	GCT	GAT	GAA	GTC	TAT	GCC	GAA	ACT	579
Thr	Val	Tyr	Gly	Asp	Glu	Glu	Phe	Ala	Asp	Glu	Val	Tyr	Ala	Glu	Thr	
170					175					180					185	
GAC	CTA	GAC	AAA	GTT	TTA	CCG	AGA	GCT	GAT	ATT	ATT	GCT	TCA	AGT	GTC	627
Asp	Leu	Asp	Lys	Val	Leu	Pro	Arg	Ala	Asp	Ile	Ile	Ala	Ser	Ser	Val	
			190						195					200		
CCT	GGG	ACC	CAT	GAA	ACT	TAT	AAA	TTA	TTT	AAT	CAA	GAA	AAA	TTT	GAT	675
Pro	Gly	Thr	His	Glu	Thr	Tyr	Lys	Leu	Phe	Asn	Gln	Glu	Lys	Phe	Asp	
			205					210					215			
TTA	ATG	AAA	GAA	AAT	GCT	ATT	TTC	CTA	AAT	GTT	GGT	CGG	GGA	ACA	AAT	723
Leu	Met	Lys	Glu	Asn	Ala	Ile	Phe	Leu	Asn	Val	Gly	Arg	Gly	Thr	Asn	
		220					225					230				
GTC	GAT	TTA	GAA	GCC	TTG	TGT	GAT	GCT	CTT	GAG	TCT	AAA	AAA	ATT	GCT	771
Val	Asp	Leu	Glu	Ala	Leu	Cys	Asp	Ala	Leu	Glu	Ser	Lys	Lys	Ile	Ala	
		235				240					245					
GGG	GCA	GGA	ATT	GAC	GTG	ACC	GAC	CCA	GAA	CCA	TTG	CCT	AAA	GGT	CAC	819
Gly	Ala	Gly	Ile	Asp	Val	Thr	Asp	Pro	Glu	Pro	Leu	Pro	Lys	Gly	His	
250					255					260					265	
CGG	GCT	TGG	CAT	ACA	GAA	AGA	CTA	TTA	ATC	ACT	CCT	CAT	GCT	TCT	GGC	867
Arg	Ala	Trp	His	Thr	Glu	Arg	Leu	Leu	Ile	Thr	Pro	His	Ala	Ser	Gly	
				270					275					280		
GGT	TAT	ACT	CTT	CCT	GAA	ACA	TGG	CGT	CGC	TTT	ATG	AAA	ATA	TTG	GAA	915
Gly	Tyr	Thr	Leu	Pro	Glu	Thr	Trp	Arg	Arg	Phe	Met	Lys	Ile	Leu	Glu	
			285					290					295			
AAA	AAT	CTC	GAT	GCC	TAT	GCA	AAT	GGT	AAG	GAA	TTG	ACA	AAT	ATT	GTT	963
Lys	Asn	Leu	Asp	Ala	Tyr	Ala	Asn	Gly	Lys	Glu	Leu	Thr	Asn	Ile	Val	
		300					305					310				
GAT	ATG	AAA	ACA	GGA	TAT	AAA	CGA	AAT	GCT	CAC	AAA					999
Asp	Met	Lys	Thr	Gly	Tyr	Lys	Arg	Asn	Ala	His	Lys					
		315				320					325					

INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID NO:8

i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SÉQUENCE ID NO:8

A) LONGUEUR :

B) TYPE : ADN

C) NOMBRE DE BRIN : double

D) CONFIGURATION : linéaire

xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE ID NO:8

GAT ATT ATT GAT TGT AAT GCT GCT ATT GTA AAT GGT GGA GGT GCT CTC	48
Asp Ile Ile Asp Cys Asn Ala Ala Ile Val Asn Gly Gly Gly Ala Leu	
1 5 10 15	
CTT GGT TTT GCT ATG AAA TAC AAA ACC AAC AAT GAC CGT GTG GAA AAG	96
Leu Gly Phe Ala Met Lys Tyr Lys Thr Asn Asn Asp Arg Val Glu Lys	
20 25 30	
TTT TTT AAA GCT AAA CAA CTT CCA GAG GAA TAC ATA CGT GGT ATC AGC	144
Phe Phe Lys Ala Lys Gln Leu Pro Glu Glu Tyr Ile Arg Gly Ile Ser	
35 40 45	
CGT GTT TAT GAT ACT CAA GAA AAT ATC GGT ATT GAC AGT GAC TTG ACC	192
Arg Val Tyr Asp Thr Gln Glu Asn Ile Gly Ile Asp Ser Asp Leu Thr	
50 55 60	
ATC TTC CCA GTG GAA TTA AAA GAT GAT TTC CCT GAC GGT TTG ACT ACA	240
Ile Phe Pro Val Glu Leu Lys Asp Asp Phe Pro Asp Gly Leu Thr Thr	
65 70 75 80	
ATT GCA CCA ATC TAT GGT GGT GGT ATG CGT CTT GGT TCT TTC ATT ATT	288
Ile Ala Pro Ile Tyr Gly Gly Gly Met Arg Leu Gly Ser Phe Ile Ile	
85 90 95	
TGG CGT AAC GAC CAT GAT TTT GTG GAC GAC GAC CTT ATC TTG GTT GAG	336
Trp Arg Asn Asp His Asp Phe Val Asp Asp Asp Leu Ile Leu Val Glu	
100 105 110	
ATT GCA TCT ACA GTA GTT GGT TTG CAA TTG TTG CAT CTT CAA ACA GAA	384
Ile Ala Ser Thr Val Val Gly Leu Gln Leu Leu His Leu Gln Thr Glu	
115 120 125	
AAC TTG GAA GAA ACG ATT CGT AAA CAA ACA GCT ATT AAT ATG GCT ATT	432
Asn Leu Glu Glu Thr Ile Arg Lys Gln Thr Ala Ile Asn Met Ala Ile	
130 135 140	
AAT ACC TTG TCT TAC TCA GAA ATC AAG GCA GTT TCA GCT ATC TTG AAT	480
Asn Thr Leu Ser Tyr Ser Glu Ile Lys Ala Val Ser Ala Ile Leu Asn	
145 150 155 160	
GAG TTG GAC GGT TTA GAA GGT CGT TTG ACA GCC TCT GTT ATC GCG GAC	528
Glu Leu Asp Gly Leu Glu Gly Arg Leu Thr Ala Ser Val Ile Ala Asp	
165 170 175	
CGT ATC GGA ATT ACT CGT TCT GTT ATT GTT AAT GCT CTT CGT AAA TTA	576
Arg Ile Gly Ile Thr Arg Ser Val Ile Val Asn Ala Leu Arg Lys Leu	
180 185 190	

GAA TCA GCT GGT ATT ATT GAA AGT CGT TCG CTT GGT ATG AAA GGC ACT	624
Glu Ser Ala Gly Ile Ile Glu Ser Arg Ser Leu Gly Met Lys Gly Thr	
195 200 205	
TAC CTC AAA GTC CTT AAC GAA GGT ATC TAC GAC AAA TTG AAA GAA TAC	672
Tyr Leu Lys Val Leu Asn Glu Gly Ile Tyr Asp Lys Leu Lys Glu Tyr	
210 215 220	

INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID NO:9

i) CARACTÉRISTIQUE DE LA SÉQUENCE ID NO:9

A) LONGUEUR :

B) TYPE : ADN

C) NOMBRE DE BRIN : double

D) CONFIGURATION : linéaire

xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE ID NO:9

ATG GCA AAT TTG CTT GAT AAA ACA CGT AAA ATT ACT TCT ATC TTG CAA	48
Met Ala Asn Leu Leu Asp Lys Thr Arg Lys Ile Thr Ser Ile Leu Gln	
1 5 10 15	
CGC TCA GTA GAT AGT TTG GAA GGA GAT CTT CCA TAC AAC AAC ATG GCT	96
Arg Ser Val Asp Ser Leu Glu Gly Asp Leu Pro Tyr Asn Asn Met Ala	
20 25 30	
GCT CAG TTG GCA GAT ATT ATT GAT TGT AAT GCT GCT ATT GTA AAT GGT	144
Ala Gln Leu Ala Asp Ile Ile Asp Cys Asn Ala Ala Ile Val Asn Gly	
35 40 45	
GGA GGT GCT CTC CTT GGT TTT GCT ATG AAA TAC AAA ACC AAC AAT GAC	192
Gly Gly Ala Leu Leu Gly Phe Ala Met Lys Tyr Lys Thr Asn Asn Asp	
50 55 60	
CGT GTG GAA AAG TTT TTT AAA GCT AAA CAA CTT CCA GAG GAA TAC ATA	240
Arg Val Glu Lys Phe Phe Lys Ala Lys Gln Leu Pro Glu Glu Tyr Ile	
65 70 75 80	
CGT GGT ATC AGC CGT GTT TAT GAT ACT CAA GAA AAT ATC GGT ATT GAC	288
Arg Gly Ile Ser Arg Val Tyr Asp Thr Gln Glu Asn Ile Gly Ile Asp	
85 90 95	
AGT GAC TTG ACC ATC TTC CCA GTG GAA TTA AAA GAT GAT TTC CCT GAC	336
Ser Asp Leu Thr Ile Phe Pro Val Glu Leu Lys Asp Asp Phe Pro Asp	
100 105 110	
GGT TTG ACT ACA ATT GCA CCA ATC TAT GGT GGT GGT ATG CGT CTT GGT	384
Gly Leu Thr Thr Ile Ala Pro Ile Tyr Gly Gly Gly Met Arg Leu Gly	
115 120 125	
TCT TTC ATT ATT TGG CGT AAC GAC CAT GAT TTT GTG GAC GAC GAC CTT	432
Ser Phe Ile Ile Trp Arg Asn Asp His Asp Phe Val Asp Asp Asp Leu	
130 135 140	
ATC TTG GTT GAG ATT GCA TCT ACA GTA GTT GGT TTG CAA TTG TTG CAT	480
Ile Leu Val Glu Ile Ala Ser Thr Val Val Gly Leu Gln Leu Leu His	
145 150 155 160	
CTT CAA ACA GAA AAC TTG GAA GAA ACG ATT CGT AAA CAA ACA GCT ATT	528
Leu Gln Thr Glu Asn Leu Glu Glu Thr Ile Arg Lys Gln Thr Ala Ile	

165					170					175						
AAT	ATG	GCT	ATT	AAT	ACC	TTG	TCT	TAC	TCA	GAA	ATC	AAG	GCA	GTT	TCA	576
Asn	Met	Ala	Ile	Asn	Thr	Leu	Ser	Tyr	Ser	Glu	Ile	Lys	Ala	Val	Ser	
			180					185					190			
GCT	ATC	TTG	AAT	GAG	TTG	GAC	GGT	TTA	GAA	GGT	CGT	TTG	ACA	GCC	TCT	624
Ala	Ile	Leu	Asn	Glu	Leu	Asp	Gly	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Thr	Ala	Ser	
		195					200					205				
GTT	ATC	GCG	GAC	CGT	ATC	GGA	ATT	ACT	CGT	TCT	GTT	ATT	GTT	AAT	GCT	672
Val	Ile	Ala	Asp	Arg	Ile	Gly	Ile	Thr	Arg	Ser	Val	Ile	Val	Asn	Ala	
	210					215					220					
CTT	CGT	AAA	TTA	GAA	TCA	GCT	GGT	ATT	ATT	GAA	AGT	CGT	TCG	CTT	GGT	720
Leu	Arg	Lys	Leu	Glu	Ser	Ala	Gly	Ile	Ile	Glu	Ser	Arg	Ser	Leu	Gly	
	225				230					235				240		
ATG	AAA	GGC	ACT	TAC	CTT	AAA	GTC	CTT	AAC	GAA	GGT	ATC	TAC	GAC	AAA	768
Met	Lys	Gly	Thr	Tyr	Leu	Lys	Val	Leu	Asn	Glu	Gly	Ile	Tyr	Asp	Lys	
			245					250						255		
TTG	AAA	GAA	TAC	GAA												783
Leu	Lys	Glu	Tyr	Glu												
			260													

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
26 avril 2001 (26.04.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/29183 A3

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N 1/20, C12Q 1/68, A23C 19/032 // C12R 1:46
- (74) Mandataire : BREESE-MAJEROWICZ; 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR00/02869
- (81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Date de dépôt international : 13 octobre 2000 (13.10.2000)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité : 99/12924 15 octobre 1999 (15.10.1999) FR
- (84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE -INRA- [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75338 Paris Cedex 07 (FR).
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : GUEDON, Eric [FR/FR]; 26, rue Jules Ferry, F-92100 Boulogne (FR). ANBA-MONDOLONI, Jamila [FR/FR]; 13, rue Charles Linné, F-78180 Montigny-le-Bretonneux (FR). DELORME, Christine [FR/FR]; 15, résidence des Basses Garennes, F-91120 Palaiseau (FR). RENAULT, Pierre [FR/FR]; 9, rue Magellan, F-78180 Montigny-le-Bretonneux (FR).
- (88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 22 novembre 2001
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

(54) Title: MUTANT LACTIC BACTERIA WITH A CAPACITY FOR OVEREXPRESSING AT LEAST ONE PEPTIDASE

(54) Titre : BACTERIES LACTIQUES MUTANTES CAPABLES DE SUREXPRESSER AU MOINS UNE PEPTIDASE

(57) Abstract: The invention relates to mutants of lactic bacteria such as *L. lactis* or *S. thermophilus* which can overexpress one or more peptidases, characterised in that at least one of the negative regulation factors of at least one of the peptidase genes of said bacteria is inactivated, said negative regulation factor being selected from a group comprising the gene *codY*, the genes of the operon *lev*, and a gene coding for a protein that is homologous with a β -glucosidase.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à des mutants de bactéries lactiques, comme *L. lactis* ou *S. thermophilus* capables de surexprimer une ou plusieurs peptidases, caractérisés en ce que l'un au moins des facteurs de régulation négative de l'un au moins des gènes des peptidases desdites bactéries est inactivé, ledit facteur de régulation négative étant choisi dans le groupe comprenant le gène *codY*, les gènes de l'opéron *lev*, un gène codant une protéine homologue à une β -glucosidase.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern al Application No
PCT/FR 00/02869

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N1/20 C12Q1/68 A23C19/032
//C12R1:46

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K C12Q A23C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, WPI Data, EP0-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KUNJI EDMUND R S ET AL: "Transport of beta-Casein-derived Peptides by the Oligopeptide Transport System Is a Crucial Step in the Proteolytic Pathway of Lactococcus lactis." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 4, 1995, pages 1569-1574, XP002141676 ISSN: 0021-9258 the whole document</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 February 2001

Date of mailing of the international search report

07.05.2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

VAN DER SCHAAL C.A.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr 1al Application No

PCT/FR 00/02869

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARUGG JOEY D ET AL: "Medium-dependent regulation of proteinase gene expression in Lactococcus lactis: Control of transcription initiation by specific dipeptides." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 177, no. 11, 1995, pages 2982-2989, XP002141677 ISSN: 0021-9193 cited in the application the whole document	
A	--- FISHER SUSAN H ET AL: "Role of CodY in regulation of the Bacillus subtilis hut operon." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 178, no. 13, 1996, pages 3779-3784, XP002160377 ISSN: 0021-9193 the whole document	7-9
A	--- DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; April 1999 (1999-04) FISHER SUSAN H: "Regulation of nitrogen metabolism in Bacillus subtilis: Vive la difference!" Database accession no. PREV199900269050 XP002160389 abstract & MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 32, no. 2, April 1999 (1999-04), pages 223-232, ISSN: 0950-382X	7-9
A	--- KUNJI E ET AL: "The proteolytic systems of lactic acid bacteria" ANTONIE VAN LEEUWENHOEK, vol. 70, 1996, pages 187-221, XP000914826 cited in the application the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR00/02869

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

7-9 in their entirety, 1-6, 10-15, 18 in part

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 00/02869

The international searching authority has established that this international application contains multiple (groups of) inventions as follows:

1. Claim nos.: 7-9 in their entirety, 1-6, 10-15, 18 in part
mutant of lactic bacterium with the gene codY inactivated
2. Claim nos.: 1-6, 10-15, 18 in part
mutant of lactic bacterium with the operon lev inactivated, apart from the mutant in 1
3. Claim nos.: 1-6 and 13-15, 18 in part
mutant of lactic bacterium with a gene coding for an inactivated beta-glu coside, apart from the mutants in 1 and 2
4. Claim nos.: 16 and 17
recombinant vector for use for identifying or selecting mutant lactic bacteria and use thereof

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demr Internationale No
PCT/FR 00/02869

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N1/20 C12Q1/68 A23C19/032
//C12R1:46

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12N C07K C12Q A23C

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
BIOSIS, WPI Data, EP0-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	KUNJI EDMUND R S ET AL: "Transport of beta-Casein-derived Peptides by the Oligopeptide Transport System Is a Crucial Step in the Proteolytic Pathway of Lactococcus lactis." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 4, 1995, pages 1569-1574, XP002141676 ISSN: 0021-9258 le document en entier --- -/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 février 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

07.05.2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

VAN DER SCHAAL C.A.

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>MARUGG JOEY D ET AL: "Medium-dependent regulation of proteinase gene expression in Lactococcus lactis: Control of transcription initiation by specific dipeptides." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 177, no. 11, 1995, pages 2982-2989, XP002141677 ISSN: 0021-9193 cité dans la demande le document en entier</p> <p>---</p>	
A	<p>FISHER SUSAN H ET AL: "Role of CodY in regulation of the Bacillus subtilis hut operon." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 178, no. 13, 1996, pages 3779-3784, XP002160377 ISSN: 0021-9193 le document en entier</p> <p>---</p>	7-9
A	<p>DATABASE BIOSIS [en ligne] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; avril 1999 (1999-04) FISHER SUSAN H: "Regulation of nitrogen metabolism in Bacillus subtilis: Vive la difference!" Database accession no. PREV199900269050 XP002160389 abrégé & MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 32, no. 2, avril 1999 (1999-04), pages 223-232, ISSN: 0950-382X</p> <p>---</p>	7-9
A	<p>KUNJI E ET AL: "The proteolytic systems of lactic acid bacteria" ANTONIE VAN LEEUWENHOEK, vol. 70, 1996, pages 187-221, XP000914826 cité dans la demande le document en entier</p> <p>-----</p>	

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n^{os}
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n^{os}
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n^{os}
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}
4. ☒ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est
7-9 complètement, 1-6, 10-15, 18 partiellement

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 7-9 complètement, 1-6 10-15 18 partiellement

Mutant de bactérie lactique avec le gène *codY* inactivé

2. revendications: 1-6 10-15 18 partiellement

Mutant de bactérie lactique avec l'opéron *lev* inactivé, à l'exception du mutant du sujet 1

3. revendications: 1-6 et 13-15 18 partiellement

Mutant de bactérie lactique avec un gène codant pour une β -glucosidase inactivée, à l'exception du mutant des sujets 1 et 2

4. revendication : 16 et 17

Vecteur recombinant utile pour identifier ou sélectionner des bactéries lactiques mutantes et son utilisation

This Page Blank (uspto)